

Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Mestrado

**POTENCIAIS CANDIDATOS A CONSTRUÇÃO DE SISTEMAS RÁPIDOS,
SENSÍVEIS E ESPECÍFICOS PARA O DIAGNÓSTICO DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

MARIA GABRIELA SAMPAIO LIRA

São Luís

2018

MARIA GABRIELA SAMPAIO LIRA

**POTENCIAIS CANDIDATOS A CONSTRUÇÃO DE SISTEMAS
RÁPIDOS, SENSÍVEIS E ESPECÍFICOS PARA O DIAGNÓSTICO DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho

São Luís

2018

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Lira, Maria Gabriela Sampaio.

Potencias candidatos a construção de sistemas rápidos, sensíveis e específicos para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina / Maria Gabriela Sampaio Lira. - 2018.

93 f.

Orientador(a): Rafael Cardoso Carvalho.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), 2018.

1. Antígenos. 2. Calazar. 3. Proteínas recombinantes. 4. Sorodiagnóstico. I. Carvalho, Rafael Cardoso. II. Título.

MARIA GABRIELA SAMPAIO LIRA

**POTENCIAIS CANDIDATOS A CONSTRUÇÃO DE SISTEMAS
RÁPIDOS, SENSÍVEIS E ESPECÍFICOS PARA O DIAGNÓSTICO DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho
Universidade Federal do Maranhão

Profª. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva
Universidade Estadual do Maranhão

Profª. Dra. Joicy Cortez de Sá
Universidade Ceuma

Profª. Dra. Solange de Araújo Melo
Universidade Estadual do Maranhão

“Deus é o que me cinge de força
e aperfeiçoa o meu caminho.”

(Salmos 18:32)

Dedico a minha família,
pelo apoio, amor incondicional, carinho e ensinamentos prestados...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida, por permitir que eu conquistasse todas as realizações que obtive até hoje e por me dar força e saúde para realizá-las.

Aos meus pais, Wilson e Lúcia, pelo amor, carinho, por sempre acreditarem nos meus sonhos, me incentivarem e darem suporte.

Ao meu irmão, Gabriel Sampaio, por todo incentivo a mim dedicado, pelo apoio, pela alegria e pelo carinho transmitido.

Ao Adamo Santos, por todo carinho, amor, torcida, conselhos e por dar suporte em todos os momentos bons ou ruins. Além disso, agradeço pela ajuda técnica na confecção da arte dos cartazes utilizados nas ações de diagnóstico do calazar e por ter aceitado fazer os áudios para divulgação das ações.

Ao Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho, agradeço pela orientação, paciência, apoio e incentivo constantes, por acreditar sempre no meu melhor e por seus ensinamentos que foram essenciais para este trabalho e para minha formação.

À Profa. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva, pelo exemplo de pessoa e profissional, pelo acolhimento, apoio, generosidade e confiança em mim depositada, pelos conhecimentos que me foram passados e pela oportunidade de concluir mais uma etapa em minha formação.

Ao Prof. Dr. Nêuton da Silva Souza, por ser mediador na realização desta etapa, pela confiança, pelos ensinamentos, conselhos, torcida e pelas palavras de apoio.

A Ranielly, agradeço por sua amizade, disposição e inestimável contribuição e esforço neste projeto e por enfrentar comigo todos os desafios desta etapa do mestrado. Sem você, com certeza, a caminhada teria sido mais difícil.

Aos amigos, Lorrane, Guilherme, Gustavo, Fernanda, Thiago e Roberta, obrigada pela força, amizade, conselhos, pelo incentivo, por estarem sempre na torcida das minhas conquistas. Agradeço pelo carinho, por escutarem os meus relatos de dificuldades, pelos conhecimentos e ajudas científicas repassadas e pelos momentos divertidos vividos.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, a coordenação, a secretaria e a todos os docentes e funcionários, pela contribuição nesta etapa da minha formação.

A turma de mestrado em Ciências da Saúde (2016-2018), agradeço pelo apoio e companheirismo. Em especial a Uiara, Francisco, Ithaynara, Carol, Rosana e Carla que me auxiliaram e apoiaram durante esta trajetória.

A Universidade Estadual do Maranhão e a Universidade Federal do Maranhão, pela contribuição em minha formação.

Ao Laboratório de Imunodiagnóstico da UEMA, especialmente ao professor Ferdinan e a Carla Janaína, pelo auxílio com os ELISAs, pelo ensinamento da técnica e outros conhecimentos compartilhados.

A Zulmira Batista, pela ajuda com as coletas de amostras dos cães, esfregaços, pela paciência, carinho e por ter me ensinado muitas coisas que hoje eu sei, relacionadas as técnicas laboratoriais. Agradeço, também, a toda equipe profissional do laboratório Simetra, que ajudou com a realização dos hemogramas.

A todos do laboratório de Anatomopatologia da UEMA. Ao prof. Fábio Henrique, pelo acolhimento no laboratório. A Renata, por ser exemplo de pessoa e profissional, por ter me auxiliado em tudo que precisei com o projeto, seja um conhecimento compartilhado, uma ajuda nas coletas ou um esfregaço. A Allana e Higor, pelo carinho e apoio nas coletas. A Tatiane, Isabel, Gustavo e Carol, pelo auxílio nas coletas e também com a leitura de algumas lâminas. A Adriana, pela ajuda com todas as punções de medula, pelos ensinamentos e paciência. Ao Fernando, pela ajuda com a PCR, agradeço pela atenção, paciência e ensinamentos. A Mylena, Alessandra, Nathálya, Sarah, Eslen, Anderson, Márcia, Joanna, Douglas, Ana Eliza, Breno, Victor, Thaís Rafisa, Ailésio, Kelvin, Wendel e Fernanda, pelo auxílio em alguma etapa do mestrado.

Ao Laboratório de Biologia Molecular da UEMA, por ter armazenado todas as amostras de soro dos cães e ter prestado auxílio com materiais. Também agradeço aos membros que me auxiliaram nas coletas de amostras dos cães.

Ao Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz (FIOCRUZ/Bahia), pela parceria e materiais disponibilizados para realização dos ELISAs.

Aos responsáveis pelas associações de moradores dos bairros Cidade Operária, Cidade Olímpica, São Cristovão e Jardim América e a escola Antônio Vieira do bairro São Cristovão, pela disponibilização dos locais para as coletas de amostras biológicas dos cães.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro do projeto maior, que permitiu e favoreceu a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos familiares, amigos, docentes, alunos de graduação e pesquisadores, que não foram nominalmente mencionados, mas que de alguma forma contribuíram na conclusão de mais uma etapa na minha vida.

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Aspectos gerais das leishmanioses	14
2.2 Leishmaniose visceral (LV)	15
2.3 Morfologia da <i>Leishmania</i>	15
2.4 Mecanismos de transmissão	16
2.5 Reservatórios	18
2.6 Leishmaniose visceral canina (LVC)	18
2.7 Diagnóstico	19
2.7.1 Diagnóstico parasitológico	19
2.7.2 Diagnóstico imunológico ou sorológico	20
2.7.3 Diagnóstico molecular	21
2.8 Proteínas recombinantes	21
2.8.1 Proteínas excretadas-secretadas	23
2.8.2 Proteínas de superfície	23
2.8.3 Proteínas intracelulares	24
2.9 Reações cruzadas	26
REFERÊNCIAS	28

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença grave, de caráter sistêmico, que pode acometer o homem e animais mamíferos, como os cães domésticos, que são tidos como os principais reservatórios da parasitose no Brasil. O diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) conta com o emprego de métodos sorológicos, parasitológicos e moleculares, entretanto, nenhuma das opções atualmente disponíveis é adequada para o monitoramento da doença, havendo a necessidade de um método diagnóstico eficiente para cães portadores de LV, bem como para fazer a distinção correta entre cães sintomáticos e assintomáticos. Dessa forma, este estudo teve o objetivo de avaliar o potencial diagnóstico sorológico de antígenos recombinantes para a LVC a fim de melhorar a forma de detecção da doença no Brasil. Foram realizadas ações de diagnóstico do calazar em bairros do Distrito Tirirical, em São Luís-MA, para avaliação clínica e coleta de sangue dos cães. O sangue coletado foi utilizado para realização de hemograma e esfregaços em lâminas de microscopia para o diagnóstico de erliquiose canina. As amostras de soro obtidas a partir do sangue, foram inicialmente triadas com kit de ELISA/S7[®], para constatação da existência de cães reagentes e não reagentes para LV, sendo os casos positivos confirmados por exame parasitológico direto. A partir dos resultados da avaliação clínica e laboratorial, os cães foram classificados em sintomáticos para LV, assintomáticos para LV, sadios ou com outra infecção. Posteriormente, os grupos de soro foram utilizados para testar o antígeno SLA e sete antígenos recombinantes de *Leishmania infantum chagasi*, quanto a função de marcadores imunológicos para o sorodiagnóstico da LVC, por meio da técnica de ELISA. Foram avaliados clinicamente e obtidas amostras biológicas de um total de 180 cães. Os sinais clínicos predominantes nos animais foram linfadenomegalia (45,55%), presença de ectoparasitos (41,66%), onicogribose (30%), pelagem opaca (27,22%), lesão de pele (22,77%), lesão de focinho/orelha (18,33%), alopecia (17,77%) e alteração no estado nutricional (17,77%). O escore clínico apresentado por cada animal permitiu determinar um ponto de corte >7 para separar os cães com LV dos cães com outra doença infecciosa. Com a triagem realizada por meio do kit de ELISA/S7[®], foram detectados anticorpos anti-*Leishmania* em 48,33% dos cães da área do Distrito Tirirical. Foram identificados, dentre os cães com LV, 26,11% (n=47) como assintomáticos e 22,22% (n=40) como sintomáticos, e entre os não reagentes para LV, 32,77% (n=59) eram sadios e 18,88% (n=34) tinham outra infecção (erliquiose canina). Três antígenos recombinantes apresentaram melhores desempenhos de sensibilidade, especificidade e elevada ou moderada acurácia pelas curvas ROC, obtendo uma precisão diagnóstica melhor que o SLA. Os demais antígenos recombinantes avaliados, apesar de reconhecerem os soros de cães sintomáticos e assintomáticos para LV, não obtiveram resultados superiores ao SLA. Portanto, os ELISAs realizados com os antígenos indicaram três proteínas como importantes candidatos para a melhoria do diagnóstico da LVC, em virtude de seus desempenhos satisfatórios em todos os parâmetros avaliados.

Palavras-chave: Antígenos; Calazar; Proteínas recombinantes; Sorodiagnóstico.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a serious disease, of a systemic character, that can affect the man and mammalian animals, such as domestic dogs, which are considered as the main parasitic reservoirs in Brazil. The diagnosis of canine visceral leishmaniasis (CVL) consists of the use of serological, parasitological and molecular methods, however, none of the currently available options is adequate to monitor the treatment or cure of the disease, requiring an efficient diagnostic method for dogs with VL, as well as to make the correct distinction between symptomatic and asymptomatic dogs. In this way, the objective is to evaluate the potential serological diagnosis of recombinant antigens for CVL in order to improve the detection of the disease in Brazil. Diagnostic actions of the calazar were carried out in neighborhoods of the Tirirical District, in São Luís-MA, for clinical evaluation and collection of blood from dogs. The collected blood was used to perform hemogram and smears on microscopy slides for the diagnosis of canine ehrlichiosis. Serum samples obtained from blood were initially screened with ELISA/S7[®] kit, to verify the presence of reactive and non-reactive dogs for VL, and the positive cases were confirmed by direct parasitological examination. From the results of clinical and laboratory evaluation, the dogs were classified as symptomatic to VL, asymptomatic to LV, healthy or with another infection. Subsequently, serum groups were used to test the antigen SLA and seven recombinant antigens of *Leishmania infantum chagasi*, as well as the function of immunological markers for the serodiagnosis of CVL, by the ELISA techniques. A total of 180 dogs were clinically evaluated and obtained biological samples. The predominant clinical signs in the animals were lymphadenomegaly (45,55%), presence of ectoparasites (41,66%), onychogribose (30%), opaque coat (27,22%), skin lesion (22,77%), muzzle/ear injury (18,33%), alopecia (17,77%) and alteration in nutritional status (17,77%). The clinical score presented by each animal allowed the determination of a cut-off point > 7 to separate VL dogs from dogs with another infectious disease. With the screening performed using the ELISA/S7[®] kit, anti-*Leishmania* antibodies were detected in 48,33% of the dogs in the Tirirical District area. Among dogs with VL, 26,11% (n=47) were identified as asymptomatic and 22,22% (n=40) as symptomatic and among the no-reactive for VL, 32,77% (n=59) were healthy and 18,88% (n=34) had another infection (canine ehrlichiosis). Three recombinant antigens presented better sensitivity, specificity and high or moderate accuracy scores for ROC curves, obtaining a better diagnostic accuracy than SLA. The other recombinant antigens evaluated, despite recognizing sera from symptomatic and asymptomatic dogs for VL, did not obtain superior results to the SLA. Therefore, ELISAs performed with the antigens indicated three proteins as important candidates for the improvement of LVC diagnosis, due to their satisfactory performances in all parameters evaluated.

Keywords: Antigens; Kalazar; Recombinant proteins; Serodiagnosis.

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses constituem um complexo de enfermidades diferenciadas que podem acometer as mucosas, a pele ou as vísceras, de acordo com o tipo de espécie envolvida e da resposta imunológica do hospedeiro (COELHO et al., 2016). A leishmaniose visceral (LV), caracterizada pelo acometimento das vísceras, é uma doença grave, de caráter sistêmico, que atinge as células do sistema mononuclear fagocitário do homem e principalmente de cães domésticos, que são tidos como os principais reservatórios da parasitose no Brasil, sendo, neste caso, designada por leishmaniose visceral canina (LVC) (SUNDAR, 2003; ASHFORD et al., 2000).

O diagnóstico da LVC conta com o emprego de diversos métodos, sejam eles parasitológicos, sorológicos ou moleculares, no entanto, nenhuma das opções atualmente disponíveis é adequada para monitorar o tratamento ou a cura da doença (FARIA; ANDRADE, 2012). O teste diagnóstico ideal deve ser sensível, específico e de fácil utilização, de forma quantitativa e não invasiva, que propicie coleta de amostras repetidas (FARIA; ANDRADE, 2012; LEITE et al., 2010). Entretanto, essas características em um só teste ainda é uma meta a ser alcançada.

As técnicas sorológicas, recomendadas pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico da LVC, são de fácil uso e auxiliam pela detecção de anticorpos circulantes anti-*Leishmania* no sangue. Mas, a sensibilidade e especificidade de tais técnicas são variáveis, dependendo do tipo, fonte, pureza e preparação do antígeno utilizado (BARROSO-FREITAS et al., 2009; ZEYREK et al., 2007).

O uso de antígeno lisado total de formas promastigotas de *Leishmania* é comum em testes sorológicos disponíveis no mercado, cuja produção depende do crescimento intrínseco do parasito (SRIVASTAVA et al., 2011). Além disso, problemas em relação aos níveis de sensibilidade e especificidade, a possibilidade de ocorrência de reações cruzadas com soros de cães infectados por agentes etiológicos de outras doenças e falhas na identificação dos casos de LVC ainda na fase assintomática (BRANDONISIO et al., 2002; PASSOS et al., 2005; SUNDAR et al., 2006), constituem-se em desvantagens da utilização deste tipo de método.

Em virtude destas eventuais dificuldades, têm-se a necessidade de melhorias nos métodos de diagnóstico sorológicos existentes. Por este motivo, o uso de antígenos recombinantes de *Leishmania* associados as técnicas sorológicas vem se mostrando uma alternativa valiosa e promissora, porque os mesmos reduzem a ocorrência de reações cruzadas, proporcionando bons percentuais de sensibilidade e especificidade, além da produção deles ser

independente do crescimento do parasito, ocorrendo de forma padronizada e uniforme (CELESTE et al., 2014).

Nesse contexto, o presente estudo empregou a técnica de ELISA para determinar a precisão diagnóstica de sete proteínas recombinantes, avaliando parâmetros de sensibilidade e especificidade, a fim de validá-las como candidatas promissoras ao desenvolvimento de um teste rápido, capaz de incrementar o diagnóstico sorológico da LVC em nosso país. Os resultados podem auxiliar na complementação de ferramentas diagnósticas atuais, no direcionamento de outras pesquisas na área e no gerenciamento eficiente da LVC, além de poder contribuir para melhorar as medidas de controle e prevenção da infecção em humanos e não-humanos.

Destaca-se que a escolha destas proteínas se deu em virtude de suas descrições como antígenos com boa capacidade de reconhecimento por anticorpos presentes nos soros de humanos e cães infectados por diferentes espécies de *Leishmania* (SOUZA et al., 2013), além do fato da escassez de estudos de aplicação destas proteínas contra soros de cães infectados por *Leishmania infantum chagasi* em áreas endêmicas no Brasil.

Tais proteínas foram caracterizadas previamente pela Equipe do Laboratório de Patologia e Bio-Intervenção do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (LPBI/CPqGM – FIOCRUZ da Bahia), que estiveram em parceria na execução desta pesquisa, pois a mesma encontrava-se inserida dentro de um projeto guarda-chuva, intitulado “Desenvolvimento de sistemas rápidos, sensíveis e específicos para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina”.

Dessa forma, os bons resultados de sensibilidade e especificidade dos antígenos recombinantes de *Leishmania* empregados neste trabalho, podem torná-los eficientes e importantes alternativas para alcançar o desenvolvimento de futuros sistemas diagnósticos sorológicos para a doença, os quais possam ser utilizados na prática clínica para a prescrição rápida da soropositividade e orientação adequada do protocolo terapêutico e controle de infecção por *Leishmania*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais das leishmanioses

As leishmanioses são inicialmente consideradas uma zoonose, mas quando o homem é participante do seu ciclo de transmissão, estas obtêm um caráter antroponótico (ALVAR et al., 2012; DESJEUX, 2004). Elas representam um sério problema de saúde pública e, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), encontram-se entre as endemias tidas como prioritárias no mundo (ABEDI-ASTANEH et al., 2016; ALVAR et al., 2012; SOOSARAEI et al., 2017).

Essas parasitoses são provocadas por protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*, que podem acometer o homem e certas espécies de mamíferos domésticos e silvestres de áreas tropicais e subtropicais (TASCA et al., 2009). De acordo com a espécie de *Leishmania* e determinados fatores dos hospedeiros envolvidos, podem ser observadas diferentes manifestações clínicas que caracterizam a leishmaniose tegumentar (LT) ou a LV (GURUNG; KANNEGANTI, 2015; KARAKUS et al., 2017).

A LT inclui duas formas clínicas, a cutânea e a mucosa (DESJEUX, 2004; DAVID; CRAFT, 2009). A forma cutânea é a mais relatada e é caracterizada pela ocorrência de lesão de pele, que pode ter localização única ou múltipla (REITHINGER et al. 2007). Enquanto que na forma mucosa, são observadas lesões localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores, provavelmente em decorrência da disseminação hematogênica do parasito na pele (DAVID; CRAFT, 2009). A LV é uma doença sistêmica cujos principais órgãos acometidos são baço, fígado, linfonodos e medula óssea, sendo considerada a forma mais grave dentre as leishmanioses (SAMPAIO et al., 2010; AL-SALEM et al., 2016).

As leishmanioses são registradas nos cinco continentes, com aspecto endêmico em 98 países e com cerca de 350 milhões de pessoas expostas ao risco de infecção (WERNECK, 2014). A prevalência global da doença é estimada em 12 milhões de casos, sendo 1 milhão de novos casos de LT e 300 mil novos casos de LV anualmente (MOEIN et al., 2018; ALVAR et al., 2012).

2.2 Leishmaniose visceral (LV)

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença tropical negligenciada caracterizada pela evolução crônica e envolvimento sistêmico, que se não tratada precocemente pode evoluir ao óbito em 90% dos casos (AL-SALEM et al., 2016).

Depois da malária a LV é a segunda maior doença parasitária com relatos de óbito no mundo, com ocorrência em 70 países (SILVA et al., 2018), principalmente em áreas rurais e suburbanas marginalizadas de Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão, Etiópia e Brasil (WERNECK, 2014). A estimativa atual de mortalidade por ano da LV é superior a 50.000 (SILVA et al., 2018), tornando-a uma das preocupações mais prevalentes no contexto de saúde pública (ZHAO et al., 2016).

Essa doença parasitária é causada por várias espécies do gênero *Leishmania*, sendo a mais comum, nas Américas, *L. infantum chagasi* (MARCILI et al., 2014). A transmissão da LV acontece por meio da picada de flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomyia* (BAUZER et al., 2007; GRAMICCIA; GRADONI, 2005; VELO et al., 2005), que ao realizarem a hematofagia, inserem as formas promastigotas flageladas do protozoário no hospedeiro mamífero (ALVAR et al., 2004).

A LV pode ser classificada em leishmaniose visceral zoonótica (LVZ) e leishmaniose visceral antroponótica (LVA). Na LVZ a transmissão acontece quando flebotomíneos se alimentam do sangue de animais silvestres ou domésticos e levam o parasito aos seres humanos (ZHAO et al., 2016). Esse tipo de leishmaniose é amplamente distribuído na bacia do Mediterrâneo, partes do Oriente Médio, Norte da África e nas Américas (ROSYPAL, 2003). Em contrapartida, a LVA é transmitida diretamente de humanos para outros humanos por meio da picada do inseto vetor infectado durante a hematofagia (CHAPPUIS et al., 2007). A LVA é encontrada, principalmente, na Índia (estado de Bihar) e em outras partes do subcontinente indiano (STAUCH et al., 2011) e no Sudão do Sul, sendo causada por *L. donovani* (JAMJOOM et al., 2004).

2.3 Morfologia da *Leishmania*

Os parasitos do gênero *Leishmania* são protozoários dimórficos que apresentam duas formas morfológicas distintas principais, denominadas de promastigotas e amastigotas (TANAKA, 2007).

As promastigotas são extracelulares, encontradas no tubo digestivo de flebotomíneos infectados, e apresentam corpo celular alongado e fusiforme, com a presença de uma bolsa flagelar, localizada na região anterior do parasito, a partir da qual parte um flagelo alongado (VANNIER-SANTOS et al., 2002).

As formas amastigotas são intracelulares obrigatórias, imóveis, que apresentam corpo celular pequeno e oblongo (TANAKA, 2007). O flagelo presente é pequeno e restrito a bolsa flagelar, por este motivo sua visualização só é possível por meio de microscopia eletrônica (VANNIER-SANTOS et al., 2002). As amastigotas são encontradas, principalmente, em macrófagos do hospedeiro mamífero, dentro de vacúolos das células do sistema fagocítico mononuclear (ZAVERUCHA DO VALLE et al., 2007).

Tanto as formas amastigotas quanto as promastigotas das espécies de *Leishmania*, assim como outros parasitos tripanossomatídeos, apresentam uma única mitocôndria ramificada que pode se prolongar por todo o comprimento da célula com um grande conteúdo de DNA em uma região próxima ao corpo basal do flagelo, denominado cinetoplasto (CAVALCANTI et al., 2008). A posição relativa dessas estruturas é importante para a classificação dos estágios do ciclo de vida dos organismos da família Trypanosomatidae (HOARE; WALLACE, 1996).

2.4 Mecanismos de transmissão

A transmissão e o ciclo evolutivo da LV, envolvem flebotomíneos e hospedeiros mamíferos (CUNNINGHAM, 2002). Durante a hematofagia, o inseto vetor ingere as formas amastigotas do parasito, encontradas em macrófagos e monócitos no sangue ou na linfa intersticial de vertebrados infectados (ZAVERUCHA DO VALLE et al., 2007). Ao serem lançadas na propóscide do inseto vetor, as amastigotas diferenciam-se em promastigotas, as quais passam por um processo de divisão chamado metaciclogênese, onde a partir daí adquirem virulência no tubo digestivo do inseto e transformam-se em uma forma indivisível e infectante (ZAVERUCHA DO VALLE et al., 2007). Posteriormente, as promastigotas migram pela faringe e cavidade bucal e ao realizar a próxima alimentação, regurgitam o material aspirado, devido ao relaxamento dos músculos responsáveis pela sucção, durante o esforço para a obtenção do sangue e, desta forma, acabam por infectar o hospedeiro mamífero (CIMERMAM; CIMERMAM, 2002) (Figura 1).

Uma vez no hospedeiro vertebrado, os parasitos podem invadir ativamente ou serem fagocitados pelas células (normalmente macrófagos) e, então, se diferenciam em amastigotas esféricas, as quais começam a se multiplicarem assexuadamente por divisão binária dentro do

fagolisossomo (CUNNINGHAM, 2002). Quando as células parasitadas se rompem as formas amastigotas disseminam-se para as células do sistema fagocítico mononuclear e, por esse motivo, serão mais uma vez fagocitadas com percurso na corrente sanguínea ou linfática, acometendo órgãos, como o baço, fígado e a medula óssea, expandindo a infecção e finalizando o ciclo evolutivo (ZAUERUCHA DO VALLE et al., 2007).

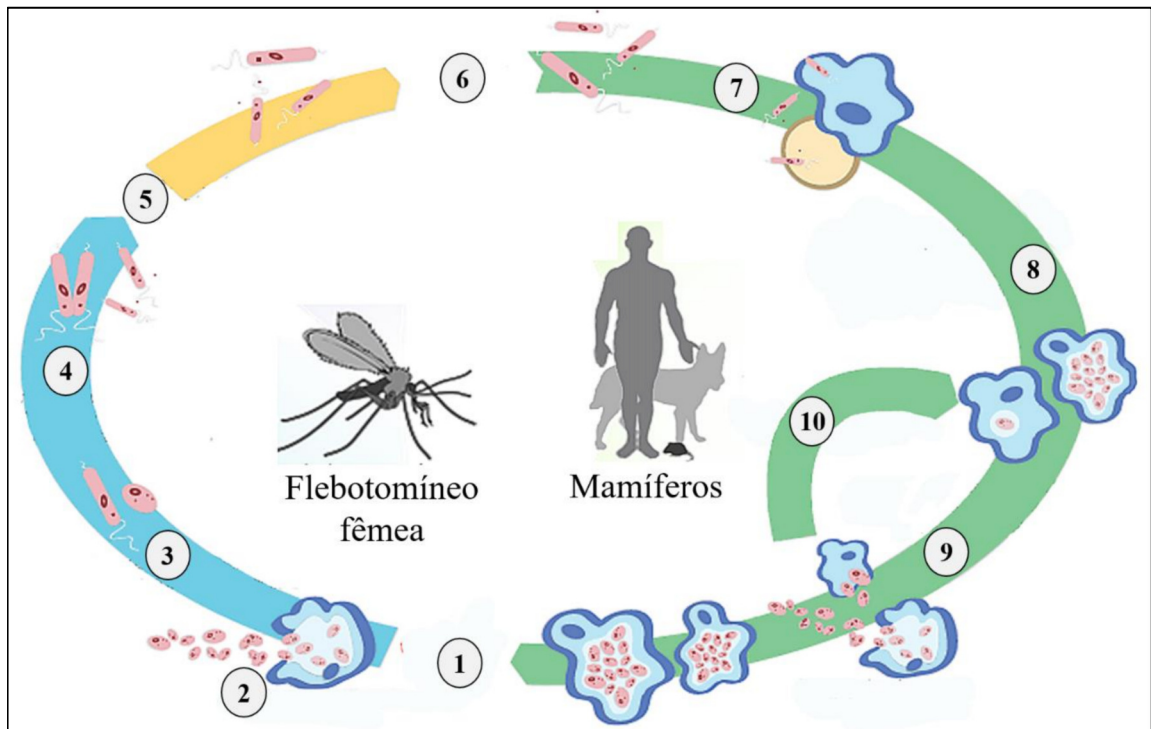


Figura 1 – Ciclo de vida da *Leishmania*. 1 – O flebotomíneo fêmea ingere as formas amastigotas do parasito durante a hematofagia. 2 – Amastigotas são liberadas no intestino do flebotomíneo. 3 – Amastigotas se diferenciam em promastigotas. 4 – Promastigotas se multiplicam e se diferenciam em promastigotas metacíclicas. 5 - Promastigotas metacíclicas migram para a válvula faringiana. 6 – Durante a hematofagia o flebotomíneo transmite as promastigotas metacíclicas ao hospedeiro mamífero. 7 – Promastigotas metacíclicas podem invadir ativamente ou serem fagocitadas por macrófagos ou neutrófilos. 8 – Promastigotas se diferenciam em amastigotas e se multiplicam por divisão binária. 9 – Amastigotas deixam as células infectadas. 10 – Amastigostas infectam novas células. Adaptado de: Frézard (2015).

Outros possíveis modos de propagação da doença, que são relatados na literatura, incluem a transmissão congênita, pela doação de sangue, e durante a realização de transplantes de órgãos (DREXLER; HOLBRO, 2014; MOLINA et al., 2003). Na Espanha, foi descrito também, a possibilidade de transmissão por meio de seringas usadas em humanos co-infectados com HIV e LV (MOLINA et al., 2003).

2.5 Reservatórios

Os hospedeiros que atuam como reservatórios da infecção por *L. infantum chagasi* incluem animais mamíferos (DANTAS-TORRES, 2007), como cães e gatos domésticos e certas espécies de animais silvestres (*Cerdocyon thous*, *Chysocyon brachyurus*, *Lycalopex vetulus*, *Didelphis albiventris* e *D. marsupialis*) (CURI et al, 2006; FIGUEIREDO et al., 2008; NOÉ et al., 2015), que são apontados como potenciais reservatórios.

Apesar da variedade de animais que podem participar do ciclo de transmissão da LV, os cães domésticos são tidos como os principais reservatórios nos estados brasileiros (ASHFORD et al., 1998) e são conhecidos por estabelecer o ciclo peri-doméstico da LV em áreas urbanas, peri-urbana e rurais (ALVAR et al., 2004).

2.6 Leishmaniose visceral canina (LVC)

Os cães domésticos têm um papel importante no ciclo da LV, devido as altas taxas de prevalência da doença nesses animais e o alto parasitismo na pele dos infectados, favorecendo a infecção pelos flebotomíneos (ALVAR et al., 2004; TAUILL, 2006), além do fato de os casos de leishmaniose visceral canina (LVC) precederem ou ocorrerem em simultâneo com casos de LV humana (ALVAR et al., 2004). No Brasil, o percentual de cães infectados que vivem em área em que a LVC é endêmica varia de 1% a 67% (GOMES et al., 2008; FRANÇA-SILVA et al., 2003; BARBOSA et al. 2010). No entanto, a prevalência de infecção em cães é provavelmente superior aos dados relatados em estudos de levantamento de casos de cães com LV.

Os sinais clínicos da LVC aparecem progressivamente e as lesões cutâneas podem estar presentes em combinação com a doença visceral (LACHAUD et al., 2002). As manifestações clínicas incluem alterações como onicogribose, alopecia, úlceras, dermatites, emagrecimento, anorexia, apatia, atrofia muscular severa, insuficiência renal, disfunções oculares e motoras, além de acometer órgãos internos, como baço, fígado e linfonodos, sendo este conjunto de sinais capaz de levar o animal ao óbito (ALVAR et al., 2004; SOLANO-GALLEGÓ et al., 2001).

A LVC pode ser categorizada quanto a sintomatologia, em sintomática, quando são observados diversos sinais clínicos e, assintomática, onde não há sinais clínicos sugestivos da doença provocados pela infecção (BARBIÉRI, 2006). Fazendo-se necessário a utilização de métodos diagnósticos capazes de fazer a discriminação entre as duas formas clínicas da doença

nos cães (FARIA; ANDRADE, 2012), para tomar as devidas medidas de controle com os animais sintomáticos e para manter os animais com formas assintomáticas, com menor manifestação de sinais clínicos e, portanto, com baixa probabilidade de progressão da infecção.

O uso de testes diagnósticos, sensíveis e específicos, pode reduzir falhas no programa de controle da LVC, por minimizar a manutenção de animais falso-negativos e a eutanásia de cães falso-positivos (FRAGA et al., 2016). A identificação e a eutanásia de cães sorologicamente positivos é uma das estratégias primárias de controle recomendada pelos governos de alguns países, como o Brasil (NUNES et al., 2010). Muito embora, alguns autores argumentam que a eutanásia de cães com LV não é uma medida eficaz para o controle (BOELAERT et al., 1999; FIGUEIREDO et al., 2010), visto que o número de cães eliminados é maior que a quantidade de cães sororreagentes, ocorrendo a eliminação de animais com outras doenças, diagnosticados erroneamente como portadores de LV (NASCIMENTO et al., 1996).

De acordo com Gontijo e Melo (2004), cães sororreagentes são eliminados todos os anos no Brasil e, apesar dos recursos e esforços investidos, o programa de controle da leishmaniose brasileira em curso não conseguiu reduzir a ocorrência da doença a um nível aceitável (AKHAVAN, 1996). Levando ao aumento da prevalência da LVC e a tornando-a um grave problema de saúde pública em vários estados brasileiros, indicando que são necessários esforços mais focados e diferenciados (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006; GONTIJO; MELO 2004).

2.7 Diagnóstico

O diagnóstico da *Leishmania* em cães, não se restringe apenas a sinais clínicos, pois são poucos sugestivos e, em alguns casos, os animais podem não manifestar sinais (assintomáticos) (ORTIZ et al., 2015; PETRAKI et al., 2015; BARBIÉRI, 2006). Em virtude destes aspectos, torna-se importante o uso de técnicas laboratoriais, compostas fundamentalmente, de três grupos de exames: os parasitológicos, os imunológicos ou sorológicos e os moleculares.

2.7.1 Diagnóstico parasitológico

Os exames parasitológicos diretos são considerados padrão de referência no diagnóstico da LV e baseiam-se na observação direta do parasito (SUNDAR; RAI, 2002). A especificidade desses testes é de 100%, mas como a distribuição dos parasitos não é uniforme em um mesmo tecido, a sensibilidade é bastante variável (BOARINO et al., 2005).

As técnicas parasitológicas podem ser realizadas por meio de aspirados de linfonodo, medula óssea ou baço, que permitirá a visualização da forma amastigota da *Leishmania* em preparações microscópicas (ZIJLSTRA; EL-HASSAN, 2001). Outros métodos convencionais para o diagnóstico parasitológico, incluem cultura *in vitro* de fragmentos ou aspirados de tecidos (BOGGILD et al. 2007; GOTO; LINDOSO 2010). Análise histopatológica de órgãos infectados, também pode ser usada para detectar parasitos intracelulares (TAFURI et al., 2001).

2.7.2 Diagnóstico imunológico ou sorológico

Os testes sorológicos são indispensáveis no diagnóstico da LV (BOARINO et al., 2005) para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* circulantes. Os mais comumente usados incluem a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), o ensaio imunoenzimático (ELISA) e teste o rápido imunocromatográfico (TRI), que empregam antígenos de *Leishmania*.

A RIFI e o ELISA são métodos amplamente usados em inquéritos de diagnóstico de doenças infectocontagiosas (ASSIS et al., 2010). A sensibilidade destes testes é muito alta, sendo eles capazes de identificar uma boa quantidade de casos soropositivos com autenticidade (AREVALO, 2011; GOTO; LINDOSO, 2010). A sensibilidade da RIFI pode variar de 90% a 100% e a especificidade de 80% a 100%, dependendo do tipo de antígeno empregado e das condições de realização do método (MAIA et al., 2012). A especificidade da RIFI é prejudicada pela ocorrência de reações cruzadas com doenças que não as leishmanioses, principalmente aquelas causadas por tripanosomatídeos (LAURENTI, 2009).

A técnica de ELISA pode apresentar uma sensibilidade que varia entre 80% e 99,5% e uma especificidade entre 81% e 100% (FUKUTANI et al., 2014), de acordo com o tipo de antígeno utilizado e alterações no protocolo (LAURENTI, 2009). Os ELISAs podem apresentar também reatividade cruzada com agentes etiológicos de outras doenças infecciosas, quando fazem a utilização de antígenos totais (ZANETTE, 2006). Entretanto, o emprego de antígenos recombinantes ou purificados aprimora os parâmetros de sensibilidade e a especificidade do método imunoenzimático (SCALONE et al., 2002).

Os TRIs possuem bons índices de sensibilidade e especificidade, são de rápida execução (5-10 minutos) e permitem a interpretação visual das reações, possibilitando seu emprego em condições de campo, no entanto, podem apresentar resultados falso-positivos (ASSIS et al., 2008).

É importante ressaltar, que o programa do Ministério da Saúde para o controle e monitoramento da leishmaniose adota um protocolo de diagnóstico da LV em cães, constituído

por técnicas sorológicas (FRAGA et al., 2016). Anteriormente era composto pelo método de triagem feito pelo ELISA e o teste de confirmação realizado pela RIFI, mas em dezembro de 2011 passou a ser composto pelo teste de triagem por meio da Plataforma Dual Path (DPP®), um TRI, e o de confirmação pelo ELISA (SILVA et al., 2011). A avaliação da sensibilidade e especificidade revelou valores baixos para o protocolo anterior que detecta a infecção por determinação da sororreatividade em cães (FRAGA et al., 2016).

2.7.3 Diagnóstico molecular

Os avanços significativos nos métodos moleculares levaram ao desenvolvimento de ferramentas alternativas para o diagnóstico das leishmanioses, todas baseadas na Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), que permite a síntese *in vitro* de uma sequência de DNA alvo específica. Com isso, tornou-se mais sensível e específico o diagnóstico da LV, sendo possível detectar o DNA de *Leishmania* em amostras de sangue, linfonodos, medula óssea e fragmentos de pele (MAURYA et al., 2005; SILVA, 2011).

A partir do surgimento da PCR convencional, múltiplos subconjuntos foram desenvolvidos para auxiliar no diagnóstico das leishmanioses e outras infecções, tais como reação de amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD) (MARTÍNEZ et al., 2003), PCR-multiplex (HARRIS et al., 1998) e polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) (GARCIA et al., 2004).

A técnica de PCR em tempo real também é relatada por diversos autores como uma importante ferramenta para quantificar e diferenciar as espécies de *Leishmania* nos hospedeiros (JARA et al., 2013; PITA-PEREIRA et al., 2012; SILVA, 2011). Além desta, as poderosas técnicas robustas de tipagem de sequência multilocus (MLST) (BOITE et al., 2012; TSUKAYAMA et al., 2009) e de tipagem de microssatélites multilocus (MLMT) (KUHLS et al., 2011) também foram implementadas. Apesar das técnicas avançadas, as mesmas requerem laboratórios e profissionais especializados para manuseio, podendo ter custo elevado para realização (BILBAO-RAMOS et al., 2017).

2.8 Proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes começaram a ser estudadas com maior propriedade com o advento da tecnologia do DNA recombinante e a partir daí passaram a ser utilizadas com várias

finalidades, como na constituição de ensaios diagnósticos mais precisos (COSTA et al., 2012; PORROZZI et al., 2007).

As proteínas descritas como antígenos de espécies da *Leishmania* são, na maioria das vezes, derivadas das formas promastigotas de parasitos inteiros, cultura ou de moléculas solúveis e elas podem ocasionar resultados falso-positivos, pelas reações cruzadas que acontecem com soros infectados com agentes etiológicos de outras doenças, assim como pela permanência de anticorpos circulantes após a cura clínica (DESJEUX, 2004).

Os antígenos recombinantes de *Leishmania* sp. são muito empregados em testes diagnósticos sorológicos da LV. A aplicabilidade desses antígenos, ao serem isolados com homogeneidade significativa, traz a vantagem de proporcionar ao teste imunológico, como o ensaio imunoenzimático, uma grande sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, reduzindo a ocorrência de reações cruzadas (PASSOS et al., 2005).

Os testes sorológicos atualmente disponíveis, que fazem a utilização de proteínas totais ou são baseados no uso de apenas uma proteína ou peptídeo como antígeno, podem apresentar especificidade variável, em razão das reações cruzadas, pois nem todos os indivíduos infectados por *Leishmania* produzem anticorpos contra determinados antígenos do parasito (BRANDONISIO et al., 2002; SUNDAR et al., 2006). Soto et al. (1998), por exemplo, ao testarem um antígeno quimérico para o diagnóstico da LV humana e canina, demonstraram uma sensibilidade que variou de 79% a 93% e especificidade de 96% a 100%. Partindo deste embasamento, várias estratégias têm sido empregadas para a validação de novas proteínas recombinantes que possam elevar o potencial diagnóstico da doença (TEIXEIRA et al., 2007; WANG et al., 2011).

Uma grande variedade de proteínas excretadas-secretadas, de superfície e intracelulares (Figura 2) tem sido reconhecida por anticorpos presentes em soros infectados com diversas formas clínicas das leishmanioses, apresentando graus diferenciados de reconhecimento (SOTO et al. 2009) e são indicadas para a substituição do antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA). No entanto, mesmo diante de evidências de que muitas proteínas recombinantes apresentam bom desempenho no sorodiagnóstico da LV, poucos foram os estudos em cães infectados por *L. infantum chagasi* oriundos de áreas endêmicas dos estados brasileiros.

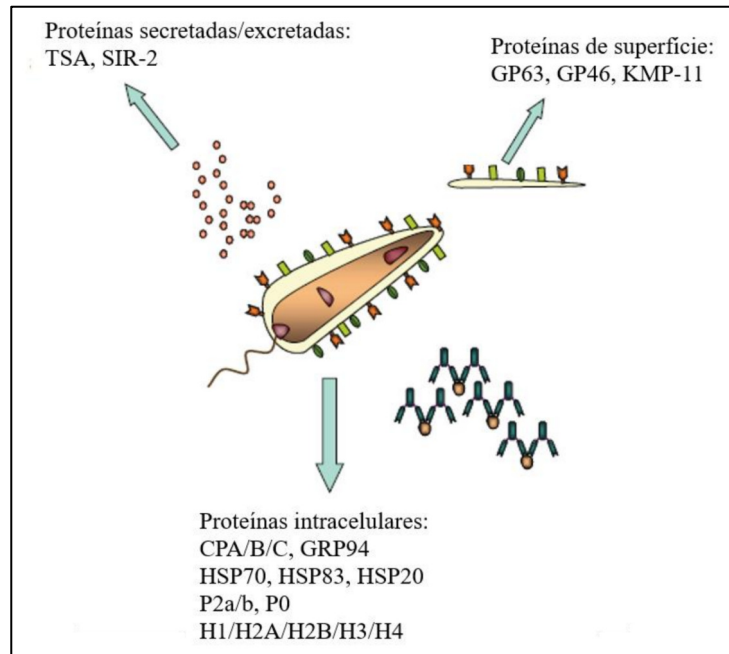


Figura 2 – Proteínas recombinantes descritas como possíveis antígenos para o sorodiagnóstico das diferentes formas clínicas das leishmanioses. Adaptado de: Soto et al. (2009).

2.8.1 Proteínas excretadas-secretadas

Dentre os antígenos excretados-secretados, a proteína rTSA de *L. major*, ao ser expressa na forma recombinante, demonstrou ter reatividade intermediária para soros de indivíduos com LV e leishmaniose cutânea (LC) (WEBB et al., 1998). A proteína rSIR-2, descoberta dois anos após a rTSA, também é uma proteína desta categoria e está localizada no citoplasma de *L. major* (ZEMZOUMI et al., 1998). Esta, foi obtida na forma recombinante e o seu uso demonstrou que se trata de uma proteína altamente antigênica durante a infecção natural, tanto em humanos sintomáticos quanto em cães com formas assintomáticas (CORDEIRO-DA-SILVA et al., 2003). O rSIR- 2 também foi reconhecido pelos soros de crianças com LV causada por *L. infantum* (SANTAREM et al., 2005, SOTO et al., 2009).

2.8.2 Proteínas de superfície

Quanto as proteínas de superfície, a protease rGP63 é uma das mais abundantes expostas à superfície das formas promastigotas do parasito e vários autores analisaram a antigenicidade desta proteína (MCCONVILLE; BLACKWELL, 1991; PIMENTA et al., 1991). A proteína recombinante rGP63 de *L. chagasi* e *L. donovani* foi obtida e empregada em ensaios de ELISA

(SHREFFLER et al., 1993), demonstrando uma alta reatividade para soros de humanos com LV aguda e apresentaram reatividade muito baixa em humanos com doença de Chagas (SHREFFLER et al., 1993). Além disso, foi descrita a existência de outra família de glicoproteína na membrana de promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania* (MCMAHON-PRATT et al., 1992), denominada rGP46 de *L. major*, que foi reconhecida por soros de humanos e cães com LV (BOCETA et al., 2000; MAALEJ et al., 2003).

Além destas, a proteína de superfície rKMP-11 (Proteína 11 de Membrana de Kinetoplástidos) de *L. donovani* e *L. infantum*, também foi utilizada como antígeno em ensaios de ELISA, e revelou acentuada reatividade em soros de humanos e cães com LV (BERBERICH et al., 1997). O antígeno rKMP-11 de *L. panamensis* também foi reconhecido por soros de americanos com LV (76%), leishmaniose cutâneo mucosa (LCM) (60%) e LC (37%) (TRUJILLO et al., 2000). Em razão disso, esta proteína é apontada como uma molécula antigênica importante nas diferentes formas clínicas da doença.

2.8.3 Proteínas intracelulares

Muitas proteínas intracelulares do parasito que interagem com o sistema imunológico após a infecção por *Leishmania* também foram caracterizadas. Neste grupo, estão incluídas as proteínas de choque térmico, as proteínas ácidas ribossomais, o nucleossomo formando histonas (REQUENA et al., 2000), proteases de cisteínas (POLLOCK et al., 2003; RAFATI et al., 2003), kinesinas (BADARÓ et al., 1996), entre outras. Normalmente, anticorpos para algumas dessas proteínas reconhecem especificamente os antígenos parasitários sem reatividade cruzada com as contrapartes do hospedeiro e essa especificidade é baseada na localização de seus determinantes antigênicos nas regiões mais divergentes dessas proteínas do parasito (SOTO et al., 2009). Por essa razão, esses antígenos são de interesse potencial para o diagnóstico.

A família de proteína P ribossomal é reconhecida pelos soros de cães e humanos com LV (REQUENA et al., 2000; SKEIKY et al., 1995; SOTO et al., 1995). Dentre os três membros da família da proteína P (rP0, rP2a e rP2b), que são constituintes da grande subunidade do ribossoma de *Leishmania*, os estudos evidenciaram que especialmente os antígenos das proteínas recombinantes P2 (rP2a e rP2b) são úteis para o diagnóstico da infecção por *Leishmania*, pois títulos substanciais de anticorpos anti-*Leishmania* foram detectados em soros de cães com LV e humanos com LCM e LV (SOTO et al., 2000; SOTO et al., 1996).

As proteínas de choque térmico são produzidas por células procarióticas e eucarióticas em resposta a uma variedade de estresses fisiológicos e elas estão entre as proteínas altamente

conservadas e abundantes encontradas nos organismos (SOTO et al., 2009). Diante disso, diferentes membros da família das proteínas de choque térmico foram descritos como antígenos após a infecção por *Leishmania* (YOUNG, 1992).

A proteína rHSP83, foi reconhecida como antígeno em uma grande porcentagem de humanos com LC ativa e LCM. (SKEIKY et al., 1995; CELESTE et al., 2004). Os soros de cães com LV também reconhecem o antígeno rHSP83 de *L. infantum* (ANGEL et al., 1996). A forma recombinante da proteína rHSP70 de várias espécies de *Leishmania* foi altamente reconhecida pelo soro de humanos com LV (QUIJADA et al., 1998; ZURITA et al., 2003), LCM (SKEIKY et al., 1995; QUIJADA et al., 1998) e LC (SKEIKY et al., 1995; ZURITA et al., 2003), além de cães com LV (QUIJADA et al., 1996), e acredita-se que ela possa ser uma candidata potencial para sorodiagnóstico da doença. Além do mais, foi descrito que rHSP83 e rHSP70 de *Leishmania* possuem propriedades adjuvantes interessantes, aumentando os níveis de sensibilidade e especificidade no reconhecimento das leishmanioses (SOTO et al., 2009).

As histonas são moléculas nucleares envolvidas na formação estrutural de nucleossomos e compactação de cromatina e, apesar de localizadas no núcleo, todas as histonas foram descritas como antígenos imunodominantes durante a infecção por *Leishmania* (REQUENA et al., 2000). As histonas H2A, H3, H2B e H4 foram obtidas como proteínas recombinantes e empregadas em ensaios sorológicos com soros de cães com LV, sendo o antígeno rH2A o mais reconhecido (72%), seguido de rH3 (68%), rH2B (60%) e rH4 (44%) (SOTO et al., 1999).

Além disso, descobriu-se que 58% dos anticorpos de humanos com LC reagem com rH2B de *L. peruviana* (MONTROYA et al., 1997), todos os soros de humanos infectados com *L. chagasi* reagiram contra o rH2A de *L. infantum* (PASSOS et al., 2005) e altos percentuais de humanos com LV da área do mediterrâneo tinham anticorpos anti-*Leishmania* rH2A e rH2B específicos (MAALEJ et al., 2003). Todos esses dados apontam que as histonas podem ser levadas em consideração no desenvolvimento de sistemas de sorodiagnóstico baseados em antígenos recombinantes do parasito.

As proteases de cisteínas (CPs) são moléculas fundamentais para a virulência de *Leishmania* (MCKERROW et al., 1993), sendo identificadas três classes de marcadores no parasito: CPB (tipo I), CPA (tipo II) e CPC (tipo III), que aparecem predominantemente expressas e ativas em formas amastigotas e, em menor número, em promastigotas (SAKANARI et al., 1997; MOTTRAM et al., 1998). A forma recombinante dessas proteases foi altamente reconhecida em casos ativos ou tratados de humanos com LC (RAFATI et al., 2001) e também em casos ativos de humanos e cães com LV (RAFATI et al., 2003).

Um estudo usando a proteína intracelular rA2 de *L. donovani*, realizado com humanos com LV de uma região endêmica, mostrou a possibilidade de detectar por ELISA anticorpos anti-A2 em 82% dos humanos com LV no Sudão e 60% na Índia (GHEDIN et al., 1997). Um estudo semelhante foi feito em cães e humanos com LV, sendo este antígeno reconhecido por 87% dos cães e 77% dos humanos sintomáticos (CARVALHO et al., 2002).

Entre as proteínas recombinantes intracelulares existentes, a chamada rK39, da família das kinesinas, tem sido um antígeno promissor no diagnóstico da LV (SRIVIDYA et al., 2012). A proteína rK39 foi empregada no diagnóstico de humanos com LV causada pelas espécies *L. chagasi* e *L. donovani* (GUIMARÃES et al., 2003; VEEKEN et al., 2003) e para o diagnóstico de LVC (PORROZZI et al., 2007; OTRANTO et al., 2005). Testes baseados nesse antígeno possuem sensibilidade em torno de 100% e grande especificidade, uma vez que os anticorpos anti-K39 são praticamente ausentes nos soros de humanos com LC, LCM ou doença de Chagas (BURNS et al., 1993). Além disso, o ELISA rK39 tem um alto valor preditivo para detectar LV em pessoas imunocomprometidas, como aqueles com AIDS (MEDRANO et al., 1998). Nos Estados Unidos, um teste rápido de imunocromatografia usando este antígeno está comercialmente disponível e adaptado para o uso em condições de campo, sendo de fácil manuseio (SRIVIDYA et al., 2012).

2.9 Reações cruzadas

Os antígenos empregados nos testes imunológicos para diagnóstico da LVC podem reagir de forma cruzada com espécies da família Trypanosomatidae ou até mesmo com microrganismos distantes filogeneticamente (SUNDAR; RAI, 2002). Esse fato, acontece em virtude da complexidade antigênica dos organismos que compartilham determinantes antigênicos comuns (LUCIANO et al., 2009).

Zanette (2014) verificou a possibilidade de reações cruzadas entre antígenos comuns a *Leishmania chagasi* e a *T. cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*, por meio dos métodos de ELISA, RIFI e imunocromatografia. Com isso, demonstraram existir reação cruzada entre esses agentes etiológicos em pelo menos umas das técnicas imunológicas avaliadas no diagnóstico da LVC, a exceção da infecção por *B. canis*, em que não constataram reatividade cruzada com antígenos de *Leishmania* por nenhuma das técnicas. Em contrapartida, Guimarães et al. (2009) relataram não haver reação cruzada entre *T. gondii*, *Neospora* sp., *Babesia* spp. e *Leishmania* spp.

No estudo de Lira et al. (2006), também avaliaram as reações cruzadas pela técnica RIFI, para antígenos de *Leishmania*, quando utilizadas amostras de soros de cães com demodicose e erliquiose e, observaram o compartilhamento de antígenos entre os agentes etiológicos, demonstrado pela ocorrência das reações cruzadas. Porém, Oliveira et al. (2008), quando avaliaram reação cruzada entre determinantes antigênicos de *Leishmania* spp., *Babesia canis* e *Ehrlichia canis*, não constataram a existência.

REFERÊNCIAS

- ABAD LPM, ALMEIDA CS, MATTOS AMM, MENDONÇA AC, ALVES MJM, PINHEIRO AC, PORROZZI R, ABASS E, STEINHOFF U, TEIXEIRA HC. Diagnostic accuracy of rKLO8 versus rK26 ELISAs for screening of canine visceral leishmaniasis. *Acta Tropica*, 166: 133-138; 2017.
- ABEDI-ASTANEH F, HAJJARAN H, YAGHOOBI-ERSHADI MR, HANAFI-BOJD AA, MOHEBALI M, SHIRZADI MR, RASSI Y, AKHAVAN AA, MAHMOUDI B. Risk mapping and situational analysis of cutaneous leishmaniasis in an endemic area of Central Iran: A GIS-Based Survey. *PLoS One*, 11(8): e0161317; 2016.
- ABREU-SILVA AL, LIMA TB, MACEDO AA, MORAES-JÚNIOR FJ, DIAS EL, BATISTA ZS, CAKABRESE KS, MORAES JLP, RABÊLO JMM, GUERRA, RMSNC. Soroprevalência, aspectos clínicos e bioquímicos da infecção por *Leishmania* em cães naturalmente infectados e fauna de flebotomíneos em uma área endêmica na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 17(supl. 1): 197-203; 2008.
- AKHAVAN D. Análise de custo-efetividade do componente de leishmaniose no projeto de controle de doenças endêmicas no nordeste do Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, 25(2): 203–252; 1996.
- AL-SALEM W, HERRICKS JR, HOTEZ PJ. A review of visceral leishmaniasis during the conflict in South Sudan and the consequences for East African countries. *Parasites & Vectors*, 9(1): 460; 2016.
- ALVAR J, CAÑAVATE C, MOLINA R, MORENO J, NIETO J. Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, 57: 1-88; 2004.
- ALVAR J, VÉLEZ ID, BERN C, HERRERO M, DESJEUX P, CANO J, JANNIN J, BOER MD. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, 7(5): e35671; 2012.
- ALVES WA, BEVILACQUA PD. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Caderno de Saúde Pública*, 20(1): 259- 265; 2004.
- AMÓRA SSA, SANTOS MJP, ALVES ND, COSTA SCG, CALABRESE KS, MONTEIRO AJ, ROCHA MFG. Fatores relacionados com a positividade de cães para leishmaniose visceral em área endêmica do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. *Ciência Rural*, 36(6): 1854-1859; 2006.

AMUSATEGUI I, SAINZ A, RODRÍGUEZ F, TESOURO MA. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. *European Journal of Epidemiology*, 18(2): 147-56; 2003.

ANDRADE CR, ANDRADE PP. Recombinant *Leishmania* proteins in the diagnosis of human kala-azar. In: BRANDÃO S, editor. *Research and control of leishmaniasis in Brazil*. Recife: FOC/CpqAm; 1995. p. 217-227.

ANDRADE CR, KIRCHHOFF LV, DONELSON JE, OTSU K. Recombinant *Leishmania* HSP90 and HSP70 are recognized by sera from visceral leishmaniasis patients but not Chagas disease patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(2): 330-335; 1992.

ANGEL SO, REQUENA JM, SOTO M, CRIADO D, ALONSO C. During canine leishmaniasis a protein belonging to the 83-kDa heat-shock protein family elicits a strong humoral response. *Acta Tropica*, 62(1): 45-56; 1996.

AREVALO J. Diagnóstico laboratorial da infecção por *Leishmania* sp. In: BARRAL A, COSTA J. *Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas*. 1ªed. Salvador: Contexto; 2011. p. 146-153.

ASHFORD DA, DAVID JR, FREIRE M, DAVID R, SHERLOCK I, EULÁLIO MC, SAMPAIO DP, BADARO R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59(1): 53-57; 1998.

ASHFORD RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 30(12-13): 1269-1281; 2000.

ASSIS J, QUEIROZ NMGP, SILVEIRA RCV, NUNES CM, OLIVEIRA TMFS, NORONHA JUNIOR ACF, NEVES MF, MACHADO RZ, BUZETTI WAS. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para leishmaniose visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 19(1): 17-25; 2010.

ASSIS TSM, BRAGA ASC, PEDRAS MJ, BARRAL AMP, SIQUEIRA IC, COSTA CHN, COSTA DL, HOLANDA TA, SOARES VYR, BIÁ M, CALDAS AJM, ROMERO GASR, RABELLO A. Validation of the rapid immunochromatographic test IT-LEISH® for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 17(2): 107-116; 2008.

AZEVEDO MAA, DIAS AKK, PAULA HB, PERRI SHV, CÁRIS M, NUNES CM. Avaliação da leishmaniose visceral canina em Poxoréo, estado do Mato Grosso, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 17(3): 123-127; 2008.

BADARÓ R, BENSON D, EULÁLIO MC, FREIRE M, CUNHA S, NETTO EM, PEDRAL-SAMPAIO D, MADUREIRA C, BURNS JM, HOUGHTON RL, DAVID JR, REED SG. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases*, 173(3): 758–761; 1996.

BANETH G. Leishmaniasis. In: GREENE CE. *Infectious diseases of the dog and cat*; 2006. p.685-698.

BARBIÉRI CL. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 28(7): 329-37; 2006.

BARBOSA DS; ROCHA AL, SANTANA AA, SOUZA CSF, DIAS RA, COSTA-JÚNIOR LM, ABREU-SILVA AL. Soroprevalência e variáveis epidemiológicas associadas à leishmaniose visceral canina em área endêmica no município de São Luís, Maranhão, Brasil. *Ciência Animal Brasileira*, 11(3): 653-659; 2010.

BARROSO-FREITAS AP, PASSOS SR, MOUTA-CONFORT E, MADEIRA MF, SCHUBACH AO, SANTOS GP, NASCIMENTO LD, MARZOCHI MC, MARZOCHI KB. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(4): 383–389; 2009.

BAUZER LGSR, SOUZA NA, MAINGON RDC, PEIXOTO AA. *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A mini-review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(1): 1–12, 2007.

BERBERICH C, REQUENA JM, ALONSO C. Cloning of genes and expression and antigenicity analysis of the *Leishmania infantum* KMP-11 protein. *Experimental Parasitology*, 85(1): 105-108; 1997.

BEZERRA FQG, BRITTO KCMS, CARDOSO FILHO AJ, SILVA JCS, AGUIAR FILHO CR, NÓBREGA CC. Inquérito sorológico da leishmaniose visceral canina no município de Ipojuca. *Revista Higiene Alimentar*, 25(194/195): 1533-1535; 2011.

BILBAO-RAMOS P, DEA-AYUELA MA, CARDENAS-ALEGRÍA O, SALAMANCA E, SANTALLA-VARGAS JA, BENITO C, FLORES N, BOLÁS-FERNÁNDEZ F. Leishmaniasis in the major endemic region of Plurinational State of Bolivia: species

identification, phylogeography and drug susceptibility implications. *Acta Tropica*, 176(17): 150-161; 2017.

BOARINO A, SCALONE A, GRADONI L, FERROGLIO E, VITALE F, ZANATTA R, GIUFFRIDA MG, ROSATI S. Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(5): 647-653; 2005.

BOCETA C, ALONSO C, JIMÉNEZ-RUIZ A. Leucine rich repeats are the main epitopes in *Leishmania infantum* PSA during canine and human visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 22(2): 55-62; 2000.

BOELAERT M, AOUN K, LIINEV J, GOETGHEBEUR E, VAN DER STUYFT P. The potential of latent class analysis in diagnostic test validation for canine *Leishmania infantum* infection. *Epidemiology and Infection*, 123(3): 499-506; 1999.

BOGGILD AK, MIRANDA-VERASTEGUI C, ESPINOSA D, AREVALO J, ADAUI V, TULLIANO G, LLANOS-CUENTAS A, LOW DE. Evaluation of a microculture method for isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions of patients in Peru. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(11): 3680-3684; 2007.

BOITE MC, MAURICIO IL, MILES MA, CUPOLILLO E. New insights on taxonomy, phylogeny and population genetics of *Leishmania (Viannia)* parasites based on multilocus sequence analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(11): e1888; 2012.

BRANDONISIO O, FUMAROLA L, MAGGI P, CAVALIERE R, SPINELLI R, PASTORE G. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 21(6): 461-464; 2002.

BRANDONISIO O, FUMAROLA L, MAGGI P, CAVALIERE R, SPINELLI R, PASTORE G. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 21: 461-464; 2002.

BURNS JM JR, SCOTT JM, CARVALHO EM, RUSSO DM, MARCH CJ, VAN NESS KP, REED SG. Characterization of a membrane antigen of *Leishmania amazonensis* that stimulates human immune responses. *The Journal of Immunology*, 146(2): 742-748; 1991.

CARRILLO E, CRUSAT M, NIETO J, CHICHARRO C, THOMAS MDEL C, MARTÍNEZ E, VALLADARES B, CAÑAVATE C, REQUENA JM, LÓPEZ MC, ALVAR J, MORENO

J. Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 26(15): 1902-1911; 2008.

CARVALHO FA, CHAREST H, TAVARES CA, MATLASHEWSKI G, VALENTE EP, RABELLO A, GAZZINELLI RT, FERNANDES AP. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 43(4): 289–295; 2002.

CARVALHO LP, SOTO M, JERONIMO S, DONDJI B, BACELLAR O, LUZ V, ORGE ORGE G, ALONSO C, JESUS AR, CARVALHO EM. Characterization of the immune response to *Leishmania infantum* recombinant antigens. *Microbes and Infection*, 5(1): 7-12; 2003.

CASTRO MB, MACHADO RZ, DE AQUINO LP, ALESSI AC, COSTA MT. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Veterinary Parasitology*, 119(1): 73-86; 2004.

CASTRO-JÚNIOR JG, FREIRE ML, CAMPOS SP, SCOPEL KK, PORROZZI R, DA SILVA ED, COLOMBO FA, DA SILVEIRA RDE C, MARQUES MJ, COIMBRA ES. Evidence of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in dogs from Juiz de Fora, Minas Gerais State, Brazil, based on immunochromatographic Dual-Path Platform (DPP*) and PCR assays. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 56(3): 225-229; 2014.

CAVALCANTI DP, THIRY M, DE SOUZA W, MOTTA MCM. The kinetoplast ultrastructural organization of endosymbiont-bearing trypanosomatids as revealed by deep-etching, cytochemical and immunocytochemical analysis. *Histochemistry and Cell Biology*, 130(6): 1177-1185; 2008.

CELESTE BJ, ANGEL SO, CASTRO LGM, GIDLUND M, Goto H. *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(11): 1591-1593; 2004.

CELESTE BJ, SANCHEZ MCA, RAMOS-SANCHEZ EM, CASTRO LGM, COSTA FAL, GOTO H. Recombinant *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of cutaneous, mucosal, and visceral leishmaniases. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(5): 860-865; 2014.

CHAPPUIS F, SUNDAR S, HAILU A, GHALIB H, RIJAL S, PEELING RW, ALVAR J, BOELAERT M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. *Nature Reviews Microbiology*, 5(11): 873–82; 2007.

CIMERMAM B, CIMERMAM S. Parasitologia Humana e seus fundamentos gerais. 2ªed. São Paulo: Atheneu; 2002.

COELHO EA, COSTA LE, LAGE DP, MARTINS VT, GARDE E, DE JESUS PEREIRA NC, LOPES EG, BORGES LF, DUARTE MC, MENEZES-SOUZA D, DE MAGALHÃES-SOARES DF, CHÁVEZ-FUMAGALLI MA, SOTO M, TAVARES CA. Evaluation of two recombinant *Leishmania* proteins identified by an immunoproteomic approach as tools for the serodiagnosis of canine visceral and human tegumentary leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 215: 63-71; 2016.

COELHO EAF, RAMÍREZ L, COSTA MAF, COELHO VTS, MARTINS VT, CHÁVEZ-FUMAGALLI MA, OLIVEIRA DM, TAVARES CAP, BONAY P, NIETO CG, ABÁNADES DR, ALONSO C, SOTO M. Specific serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis using *Leishmania* species ribosomal protein extracts. *Clinical and Vaccine Immunology*, 16(12): 1774–1780; 2009.

CORDEIRO-DA-SILVA A, CARDOSO L, ARAÚJO N, CASTRO H, TOMÁS A, RODRIGUES M, CABRAL M, VERGNES B, SERENO D, OUAISSI A. Identification of antibodies to *Leishmania* silent information regulatory 2 (SIR2) protein homologue during canine natural infections: pathological implications. *Immunology Letters* 86(2): 155–162; 2003.

COSTA MM, PENIDO M, DOS SANTOS MS, DORO D, DE FREITAS E, MICHALICK MS, GRIMALDI G, GAZZINELLI RT, FERNANDES AP. Improved canine and human visceral leishmaniasis immunodiagnosis using combinations of synthetic peptides in enzyme-linked immunosorbent assay. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(5): e1622; 2012.

COURA-VITAL W, MARQUES MJ, VELOSO VM, ROATT BM, AGUIAR-SOARES RD, REIS LE, BRAGA SL, MORAIS MH, REIS AB, CARNEIRO M. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(8): e1291; 2011.

CUNNINGHAM AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Experimental and Molecular Pathology*, 72(2): 132-141; 2002.

CURI NHA, MIRANDA I, TALAMONI SA. Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian national park. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(1): 99-101; 2006.

DANTAS-TORRES F, BRANDÃO-FILHO SP. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 48(3): 151–6; 2006.

DANTAS-TORRES F, DE PAIVA-CAVALCANTI M, FIGUEREDO LA, MELO MF, DA SILVA FJ, DA SILVA AL, ALMEIDA EL, BRANDÃO-FILHO SP. Cutaneous and visceral leishmaniasis in dogs from a rural community in northeastern Brazil. *Veterinary Parasitology*, 170(3-4): 313–317; 2010.

DANTAS-TORRES F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Veterinary Parasitology*, 149(3-4): 139-146; 2007.

DAVID CV, CRAFT N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatology and Therapy*, 22(6): 491-502; 2009.

DE ARRUDA MM, FIGUEIREDO FB, CARDOSO FA, HIAMAMOTO RM, BRAZUNA JC, DE OLIVEIRA MR, NORONHA EF, ROMERO GA. Validity and reliability of enzyme immunoassays using *Leishmania major* or *L. infantum* antigens for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. *PLoS One*, 26(8): e69988; 2013.

DE OLIVEIRA CI, NASCIMENTO IP, BARRAL A, SOTO M, BARRAL-NETTO M. Challenges and perspectives in vaccination against leishmaniasis. *Parasitology international*, 58(4): 319-324; 2009.

DE SOUZA, C. M., SILVA, E. D., ANO BOM, A. P., BASTOS, R. C., NASCIMENTO, H. J. and DA SILVA JUNIOR, J. G. Evaluation of an ELISA for canine leishmaniasis immunodiagnostic using recombinant proteins. *Parasite Immunology*, 34(1): 1-7; 2012.

DESJEUX P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 27(5): 305-318; 2004.

DIAS EL, BATISTA ZS, GUERRA RMSNC, CALABRESE KS, LIMA TB E ABREU-SILVA AL. Canine visceral leishmaniasis (cvl): seroprevalence, clinical, hematological and biochemical findings of dogs naturally infected in an endemic area of São José de Ribamar municipality, Maranhão state, Brazil. *Ciência Animal Brasileira*, 9(3): 740-745; 2008.

DINIZ SA, SILVA FL, CARVALHO NETA AC, BUENO R, GUERRA RM, ABREU-SILVA AL, SANTOS RL. Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. *Journal of Infection in Developing Countries*, 2(1): 24-33; 2008.

DREXLER B, HOLBRO A. Unexpected bone marrow finding in a patient with pancytopenia after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 124(5): 678; 2014.

FARIA AR, ANDRADE HM. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 3(2): 47-57; 2012.

FARIAS FBB. Indicador de cobertura pré-natal: uma análise especial em São Luís/MA [Tese de doutorado]. Ribeirão Preto: Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Curso de Enfermagem em Saúde Pública; 2013.

FEITOSA MM, IKEDA FA, LUVIZOTTO MVR, PERRI SHV. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). *Clínica Veterinária*, 5(28): 36-42; 2000.

FERREIRA MG, FATTORI KR, SOUZA F, LIMA VM. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. *Veterinary Parasitology*, 165(1-2): 150–154; 2009.

FIGUEIREDO FB, BARBOSA FILHO CJL, SCHUBACH EYP, PEREIRA AS, NASCIMENTO LD, MADEIRA MF. Relato de caso autóctone de leishmaniose visceral canina na zona sul do município do Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 43(1): 98-9; 2010.

FIGUEIREDO FB, GREMIÃO ID, PEREIRA SA, FEDULO LP, MENEZES RC, BALTHAZAR DA, SCHUBACH TM, MADEIRA MF. First report of natural infection of a bush dog (*Speothos venaticus*) with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(2): 200-201; 2008.

FRAGA DBM, PACHECO LV, BORJA LS, TUY PGSE, BASTOS LA, SOLCÀ MS, AMORIM LDAF, VERAS PST. The rapid test based on *Leishmania infantum* chimeric rK28 protein improves the diagnosis of canine visceral leishmaniasis by reducing the detection of false-positive dogs. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(1): e0004333; 2016.

FRANÇA-SILVA JC, COSTA RT, SIQUEIRA AM, MACHADO-COELHO GLL, COSTA CA, MAYRINK W, VIEIRA EP, COSTA JS, GENARO O, NASCIMENTO E. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros municipally, Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 111(2-3): 161-173; 2003.

FREITAS JC, LOPES-NETO BE, DE ABREU CR, COURA-VITAL W, BRAGA SL, REIS AB, NUNES-PINHEIRO DC. Profile of anti-*Leishmania* antibodies related to clinical picture in canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science*, 93(2): 705-9; 2012.

FRÉZARD FJG. A caminho da cura da leishmaniose visceral canina. In: _____. *Lipossomas como sistemas carreadores de fármacos para o tratamento da leishmaniose visceral canina*. Brasília: IBICT, Canal Ciência; 2015.

FUKUTANI KF, FIGUEIREDO V, CELES FS, CRISTAL JR, BARRAL A, BARRAL-NETTO M, DE OLIVEIRA CI. Serological survey of *Leishmania* infection in blood donors in Salvador, Northeastern Brazil. *BMC infectious diseases*, 14(1): 1; 2014.

GARCIA L, KINDT A, BERMUDEZ H, LLANOS-CUENTAS A, DE DONCKER S, AREVALO J, TINTAYA KWQ, DUJARDIN JC. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5): 2294-2297; 2004.

GHEDIN E, ZHANG WW, CHAREST H, SUNDAR S, KENNEY RT, MATLASHEWSKI G. Antibody response against a *Leishmania donovani* amastigote-stage-specific protein in patients with visceral leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 4(5): 530–535; 1997.

GIL ES, KUBOTA LT, YAMAMOTO YI. Alguns aspectos de imunoensaios aplicados à química analítica. *Química Nova*, 229(6): 874- 881; 2009.

GOMES YM, CAVALCANTI MP, LIRA RA, ABATH FGC, ALVES LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. *The Veterinary Journal*, 175(1): 45-52; 2008.

GONÇALVES BS. Leishmaniose visceral canina na área urbana de Cuiabá – MT: Comparação de técnicas laboratoriais, tentativa de desenvolvimento de metodologia para diagnóstico e caracterização da espécie de *Leishmania* circulante em amostra selecionada [Dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro: Escola Nacional Pública Sérgio Arouca, Curso de Ciências Biológicas; 2010.

GONTIJO CMF, MELO MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 7(3): 338-349; 2004.

GOTO H, LINDOSO JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 8(4): 419-433; 2010.

GOUVÊA MV, MENDONÇA IL, CRUZ MSP, COSTA CHN, BRAGA JU, WERNECK GL. Predictive factors for *Leishmania infantum* infection in dogs examined at a veterinary teaching hospital in Teresina, state of Piauí, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 49(1): 107-11; 2016.

GRAMICCIA M, GRADONI L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*, 35(11-12): 1169–1180; 2005.

GREINER M, PFEIFFER D, SMITH RD. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Preventive Veterinary Medicine*, 45(1-2): 23-41; 2000.

GUIMARÃES AM, ROCHA CMBM, OLIVEIRA TMFS, ROSADO IR, MORAIS LG, SANTOS RRD. Fatores associados à soropositividade para *Babesia*, *Toxoplasma*, *Neospora* e *Leishmania* em cães atendidos em nove clínicas veterinárias do município de Lavras, MG. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 18(supl. 1): 49-53; 2009.

GUIMARÃES CSF, LEMOS EM, COREY R, DIETZE R. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68(3): 321–324; 2003.

GUIMARAES MC, CELESTE BJ, CORRALES EM, ANTUNES CM. Comparison on the performance of *Leishmania major*-like and *Leishmania braziliensis braziliensis* as antigen for New World leishmaniasis IgG-immunofluorescence test. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 33(6): 503–508; 1991.

GURUNG P, KANNEGANTI TD. Innate immunity against *Leishmania* infections. *Cellular Microbiology*, 17(9): 1286-1294; 2015.

HARRIS E, KROPP G, BELLI A, RODRIGUEZ B, AGABIAN N. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(7): 1989-1995; 1998.

HOARE CA, WALLACE FG. Developmental stages of trypanosomatid Xagellates: a new terminology. *Nature*, 212: 1385-1386; 1996.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Anuário estatístico do Brasil. Rio de Janeiro: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2017.

INIESTA L, FERNÁNDEZ-BARREDO S, BULLE B, GÓMEZ MT, PIARROUX R, GÁLLEGO M, ALUNDA JM, PORTÚS M. Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(5): 1137-1141; 2002.

INIESTA V, CORRALIZA I, CARCELÉN J, GÓMEZ GORDO L, FERNÁNDEZ-COTRINA J, PAREJO JC, CARRIÓN J, SOTO M, ALONSO C, GÓMEZ NIETO C. *Leishmania major* infection in susceptible and resistant mice elicit a differential humoral response against a total soluble fraction and defined recombinant antigens of the parasite. *Parasitology Research*, 102(5): 887-893; 2008.

JAMJOOM MB, ASHFORD RW, BATES PA, CHANCE ML, KEMP SJ, WATTS PC, NOYES HA. *Leishmania donovani* is the only cause of visceral leishmaniasis in east Africa; previous descriptions of *L. infantum* and *L. archibaldi* from this region are a consequence of convergent evolution in the isoenzyme data. *Parasitology*, 129(04): 399–409; 2004.

JARA M, ADAUI V, VALENCIA BM, MARTÍNEZ D, ALBA M, CASTRILLON C, CRUZ M, CRUZ I, VAN DER AUWERA G, LLANOS-CUENTAS A. Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania (Viannia)* organisms in skin and mucosal lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(6): 1826-1833; 2013.

JENSEN AT, GASIM S, ISMAIL A, GAAFAR A, KURTZHALS JA, KEMP M, EL HASSAN AM, KHARAZMI A, THEANDER TG. Humoral and cellular immune responses to synthetic peptides of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11. *Scandinavian Journal of Immunology*, 48(1): 103-109; 1998.

KARAKUŞ M, NASEREDDIN A, ONAY H, KARACA EOÈ ZKEKLIKÇËI A, JAFFE CL, et al. Epidemiological analysis of *Leishmania tropica* strains and giemsa-stained smears from Syrian and Turkish leishmaniasis patients using multilocus microsatellite typing (MLMT). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(4): e0005538; 2017.

KRAWCZAK FA. *Leishmania*, Babesia and Ehrlichia in urban pet dogs: co-infection or cross-reaction in serological methods?. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48(1): 64-68; 2015.

KUHLS K, ALAM MZ, CUPOLILLO E, FERREIRA GEM, MAURICIO IL, ODDONE R, FELICIANGELI MD, WIRTH T, MILES MA, SCHÖNIAN G. Comparative microsatellite typing of New World *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent Old World origin. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5: e1155; 2011.

LACHAUD L, CHABBERT E, DUBESSAY P, DEREURE J, LAMOTHE J, DEDET JP, BASTIEN P. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. *Parasitology*, 125(Pt 3): 197–207; 2002.

LANGLOTZ CP. Fundamental measures of diagnostic examination performance: usefulness for clinical decision making and research. *Radiology*, 228(1): 3-9; 2003.

LAURENTI MD. Correlation between parasitological and serological diagnosis in canine american visceral leishmaniasis. *Bepa*, 6(67): 13-23; 2009.

LEITE RS, FERREIRA SA, ITUASSU LT, DE MELO MN, DE ANDRADE AS. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. *Veterinary Parasitology*, 170(3-4): 201-6, 2010.

LEMOS EM, LAURENTI MD, MOREIRA MA, REIS AB, GIUNCHETTI RC, RAYCHAUDHURI S, DIETZE R. Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect) in dogs with and without signs of the disease. *Acta Tropica*, 107(2): 205-207; 2008.

LEVIN MJ, VAZQUEZ M, KAPLAN D, SCHIJMAN AG. The *Trypanosoma cruzi* ribosomal P protein family: classification and antigenicity. *Parasitology Today*, 9(10): 381-38; 1993.

LIMA IS, SILVA JS, ALMEIDA VA, JUNIOR FG, SOUZA PA, LARANGEIRA DF, MOURA-NETO JP, FRAGA DBM, FREITAS LAR, DOS-SANTOS WLC. Severe clinical presentation of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs with disruption of the splenic white pulp. *PLoS One*, 9(2): e87742; 2014.

LIMA VMF, BIAZZONO L, SILVA AC, CORREA APFL, LUVIZOTTO MCR. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by an enzyme immunoassay using protein A in naturally infected dogs. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 25(4): 215-218; 2005.

LIRA RA, CAVALCANTI MP, NAKAZAWA M, FERREIRA AG, SILVA ED, ABATH FG, ALVES LC, SOUZA WV, GOMES YM. Canine visceral leishmaniosis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniosevisceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniosevisceral-canina-Bio-Manguinhos kits. *Veterinary Parasitology*, 137(1-2): 11-16; 2006.

LUCIANO RM, LUCHEIS SB, TRONCARELLI MZ, LUCIANO DM, LANGONI H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 46(3): 181-187; 2009.

LUZ ZM, SILVA AR, SILVA FO, CALIGIORNE RB, OLIVEIRA E, RABELLO A. Lesion aspirate culture for the diagnosis and isolation of *Leishmania* spp. from patients with cutaneous leishmaniasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(1): 62-66; 2009.

MAALEJ IA, CHENIK M, LOUZIR H, BEN SALAH A, BAHLOUL C, AMRI F, DELLAGI K. Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68(3): 312-320; 2003.

MADEIRA MF, SERRA CM, UCHOA CM, DUARTE R, CRUZ DA, PERDOMO CC. Leishmaniose canina: avaliação sorológica de 310 cães na região de Itaipu, Rio de Janeiro. *Cadernos de Saúde Pública*, 16(2): 568; 2000.

MAIA Z, LÍRIO M, MISTRO S, MENDES CM, MEHTA SR, BADARO R. Comparative study of rK39 *Leishmania* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(1): p.e1484, 2012.

MANNA L, REALE S, VITALE F, GRAVINO AE. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. *Research in Veterinary Science*, 87(1): 76-8; 2009.

MANZILLO VF, MUCCIO TD, CAPPIELLO S, SCALONE A, PAPANCONI R, FIORENTINO E, GIZZARELLI M, GRAMICCIA M, GRADONI L, OLIVA G. Prospective study on the incidence and progression of clinical signs in naïve dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(5): e2225; 2013.

MARCILI A, SPERANÇA MA, COSTA AP, MADEIRA MF, SOARES HS, SANCHES CO, ACOSTA IDA C, GIROTTO A, MINERVINO AH, HORTA MC, SHAW JJ, GENNARI SM. Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of *Leishmania (L.) infantum chagasi* in South America. *Infection, Genetics and Evolution*, 25: 44–51; 2014.

MARCONDES M, BIONDO AW, GOMES AAD, SILVA ARS, VIEIRA RFC, CAMACHO AA. Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. *Veterinary Parasitology*, 175(1-2): 15-19; 2011.

MARTÍNEZ E, ALONSO V, QUISPE A, THOMAS MC, ALONSO R, PINERO JE, GONZALEZ AC, ORTEGA A, VALLADARES B. RAPD method useful for distinguishing *Leishmania* species: design of specific primers for *L. braziliensis*. *Parasitology*, 127(Pt 6): 513-517; 2003.

MAURYA R, SINGH RK, KUMAR B, SALOTRA P, RAI M, SUNDAR S. Evaluation of PCR for diagnosis of Indian kala-azar and assessment of cure. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(7): 3038–41; 2005.

MCCONVILLE MJ, BLACKWELL JM. Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(23): 15170–15179; 1991.

MCKERROW JH, SUN E, ROSENTHAL PJ, BOUVIER J. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annual Review of Microbiology*, 47: 821–853; 1993.

MCMAHON-PRATT D, TRAUB-CSEKO Y, LOHMAN KL, ROGERS DD, BEVERLEY SM. Loss of the GP46/M-2 surface membrane glycoprotein gene family in the *Leishmania braziliensis* complex. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 50(1): 151–160; 1992.

MEDEIROS-SILVA V, GURGEL-GONÇALVES R, NITZ N, MORALES LEDA, CRUZ LM, SOBRAL IG, BOITÉ MC, FERREIRA GEM, CUPOLILLO E, ROMERO, GAS. Successful isolation of *Leishmania infantum* from *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae) collected from naturally infected dogs. *BMC Veterinary Research*, 11: 258; 2015.

MEDRANO FJ, CAÑAVATE C, LEAL M, REY C, LISSEN E, ALVAR J. The role of serology in the diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type-1. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59(1): 155–162; 1998.

MENEZES-SOUZA D, MENDES TAO, GOMES MS, REIS-CUNHA JL, NAGEM RAP, CARNEIRO CM, COELHO EAF, GALVÃO LMC, FUJIWARA RT, BARTHOLOMEUA DC. Epitope mapping of the HSP83 protein of *Leishmania braziliensis* discloses novel targets for Immunodiagnosis of tegumentary and visceral clinical forms of leishmaniasis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 21(7): 949–959; 2014.

MOEIN D, MASOUD D, SAEED M, ABBAS D. Epidemiological Aspects of Cutaneous Leishmaniasis during 2009-2016 in Kashan City, Central Iran. *Korean Journal Parasitology*, 56(1): 21-24; 2018.

MOHEBALI M, HAJJARAN H, HAMZAVI Y, MOBEDI I, ARSHI S, ZAREI Z, AKHOUNDI B, NAEINI KM, AVIZEH R, FAKHAR M. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. *Veterinary Parasitology* 129(3-4): 243-251; 2005.

MOLINA R, GRADONI L, ALVAR J. HIV and the transmission of *Leishmania*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 97(suppl 1): 29-45; 2003.

MONTOYA Y, LEON C, TALLEDO M, NOLASCO O, PADILLA C, MUÑOZ-NAJAR U, BARKER DC. Recombinant antigens for specific and sensitive serodiagnosis of Latin American tegumentary leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 91(6): 674–676; 1997.

MORENO EC, GONÇALVES AV, CHAVES AV, MELO MN, LAMBERTUCCI JR, ANDRADE AAS, NEGRÃO-CORRÊA D, ANTUNES CMF, CARNEIRO M. Inaccuracy of enzyme-linked immunosorbent assay using soluble and recombinant antigens to detect asymptomatic infection by *Leishmania infantum*. PLoS Neglected Tropical Diseases, 3(10): e536; 2009.

MORENO J, ALVAR J. Canine leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model. Trends in Parasitology, 18(9): 399-405; 2002.

MOSHFE A, MOHEBALI M, EDRISSIAN G, ZAREI Z, AKHOUNDI B, KAZEMI B, JAMSHIDI S, MAHMOODI M. Canine visceral leishmaniasis: asymptomatic infected dogs as a source of *L. infantum* infection. Acta Tropica, 112(2): 101–105; 2009.

MOTTRAM JC, BROOKS DR, COOMBS GH. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interactions. Current Opinion in Microbiology, 1(4): 455-460; 1998.

MYLONAKIS ME, BORJESSON DL, LEONTIDES L, SIARKOU VI, THEODOROU K, KOUTINAS AF. Cytologic patterns of lymphadenopathy in canine monocytic ehrlichiosis. Veterinary Clinical Pathology, 40(1): 78-83; 2011.

NASCIMENTO MDSB, COSTA JML, FIORI BIP, VIANA GMC, G. FILHO MS, ALVIMAC, BASTOS OC, N AKATANI M, REED S, BADARÓ R, SILVA AR, BURATTINI MN. Aspectos epidemiológicos determinantes na manutenção da leishmaniose visceral no Estado do Maranhão - Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 29: 233-240; 1996.

NOÉ P, DOMINGOS SL, OSHIRO ET, LIMA RB, PIRMEZ C, PEDROSO TC, BABO-TERRA VJ. Detection of *Leishmania chagasi* in cats (*Felis catus*) from viscera leishmaniasis endemic area in Brazil. Ciência Animal, 25 (4): 03-14; 2015.

NUNES CM, PIRES MM, DA SILVA KM, ASSIS FD, GONÇALVES FILHO J, PERRI SH. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. Veterinary Parasitology, 170(1-2): 131-3; 2010.

NUNES JB, LAURENTI MD, KANAMURA HY, PEREIRA AA, COLOMBO FA, MARQUES MJ. *Leishmania infantum* infection in dogs from the southern region of Minas Gerais state, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 3: 58-75; 2016.

OLIVEIRA TMS. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay

and indirect fluorescent antibody test. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 17(1): 7-11, 2008.

ORTIZ M, MON C, HERRERO JC, OLIET A, RODRÍGUEZ I, ORTEGA O, GALLAR P, HINOSTROZA J, COBO G, DEL ALAMO M, JIMÉNEZ J, TORRES R, DIGIOGIA C, SAN MARTIN J, VIGIL AI, BLANCO J. Glomerulonephritis and cryoglobulinemia: first manifestation of visceral leishmaniasis. *Clinical Nephrology*, 83(6): 370-7; 2015.

OTRANTO D, PARADIES P, DE CAPRARIIS D, STANNECK D, TESTINI G, GRIMM F, DEPLAZES P, CAPELLI G. Toward diagnosing *Leishmania infantum* infection in asymptomatic dogs in an area where leishmaniasis is endemic. *Clinical and Vaccine Immunology*, 16(3): 337–343; 2009.

OTRANTO D, PARADIES P, SASANELLI M, LEONE N, DE CAPRARIIS D, CHIRICO J, SPINELLI R, CAPELLI G, BRANDONISIO O. Recombinant K39 dipstick immunochromatographic test: a new tool for the serodiagnosis of canine leishmaniasis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17(1): 32–37; 2005.

PARADIES P, SASANELLI M, DE CAPRARIIS D, TESTINI G, TRAVERSA D, LIA RP, DANTAS-TORRES F, OTRANTO D. Clinical and laboratory monitoring of dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *The Veterinary Journal*, 186 (3): 370–373; 2010.

PASSOS S, CARVALHO LP, ORGE G, JERÔNIMO SM, BEZERRA G, SOTO M, ALONSO C, CARVALHO EM. Recombinant *Leishmania* antigens for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(10): 1164-1167; 2005.

PAZ GF. Association between the prevalence of infestation by *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* and the presence of anti-*Leishmania* antibodies: A case-control study in dogs from a Brazilian endemic area. *Preventive Veterinary Medicine*, 97(2): 131–133; 2010.

PENAFORTE KM, BELO VS, TEIXEIRA-NETO RG, RIBEIRO RA, OLIVEIRA RB, SCHETTINI DA, SILVA ES. *Leishmania* infection in a population of dogs: an epidemiological investigation relating to visceral leishmaniasis control. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 22(4): 592-596; 2013.

PETRAKI A, KITTOU N, HADZIYANNIS E, DOURAKIS SP. Cryoglobulinemic purpura in visceral leishmaniasis. *Journal of Infection*, 71(6): 271-3; 2015.

PIMENTA PF, SARAIVA EM, SACKS DL. The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. *Experimental Parasitology*, 72(2): 191–204; 1991.

PITA-PEREIRA D, LINS R, OLIVEIRA MP, LIMA RB, PEREIRA B, MOREIRA OC, BRAZIL RP, BRITTO C. SYBR Green-based Real-Time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniases. *Parasites & Vectors*, 5: 15; 2012.

POLLOCK KG, MCNEIL KS, MOTTRAM JC, LYONS RE, BREWER JM, SCOTT P, COOMBS GH, ALEXANDER J. The *Leishmania mexicana* cysteine protease, CPB2.8, induces potent Th2 responses. *The Journal of Immunology*, 170(4): 1746–1753; 2003.

PORROZZI R, SANTOS DA COSTA MV, TEVA A, FALQUETO A, FERREIRA AL, DOS SANTOS CD, FERNANDES AP, GAZZINELLI RT, CAMPOS-NETO A, GRIMALDI GJr. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14(5): 544-8; 2007.

QUIJADA L, REQUENA JM, SOTO M, ALONSO C. Analysis of the antigenic properties of the *L. infantum* HSP70: design of synthetic peptides for specific serodiagnosis of human leishmaniasis. *Immunology Letters*, 63(3): 169-174; 1998.

QUIJADA L, REQUENA JM, SOTO M, ALONSO C. During canine viscero-cutaneous leishmaniasis the anti-Hsp70 antibodies are specifically elicited by the parasite protein. *Parasitology*, 112(3): 277–284; 1996.

QUILEZ J, MARTÍNEZ V, WOOLLIAMS JA, SANCHEZ A, PONG-WONG R, KENNEDY LJ, QUINNELL RJ, OLLIER WE, ROURA X, FERRER L, ALTET L, FRANCINO O. Genetic control of canine leishmaniasis: genome-wide association study and genomic selection analysis. *PLoS One*, 7(4): e35349; 2012.

RAFATI S, NAKHAE A, TAHERI T, GHASHGHAI A, SALMANIAN AH, JIMENEZ M, MOHEBALI M, MASINA S, FASEL N. Expression of cysteine proteinase type I and II of *Leishmania infantum* and their recognition by sera during canine and human visceral leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, 103(3-4): 143–151; 2003.

RAFATI S, SALMANIAN AH, HASHEMI K, SCHAFF C, BELLI S, FASEL N. Identification of *Leishmania major* cysteine proteinases as targets of the immune response in humans. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 113(1): 35–43; 2001.

RAFATI S, ZAHEDIFARD F, NAZGOUEE F. Prime-boost vaccination using cysteine proteinases type I and II of *Leishmania infantum* confers protective immunity in murine visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 24(12): 2169-2175; 2006.

REITHINGER R, DUJARDIN JC, LOUZIR H, PIRMEZ C, ALEXANDER B, BROOKER S. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*, 7(9): 581e596; 2007.

REQUENA JM, ALONSO C, SOTO M. Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. *Parasitology Today*, 16(6): 246–250; 2000.

RODRÍGUEZ-MORALES O, BALLINAS-VERDUGO MA, ALEJANDRE-AGUILAR R, REYES PA, ARCE-FONSECA M. *Trypanosoma cruzi* congenital transmission in dogs with Chagas disease: experimental case report. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 11(10): 1365-70; 2011.

ROSATI, S.; ORTOFFI, M.; PROFITI, M.; MANELLI, A.; MIGNONI, W.; BOLLO, E.; GRADONI, L. Prokaryotic expression and antigenic characterization of three recombinant *Leishmania* antigens for serological diagnosis of canine leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10(6): 1153-1156; 2003.

ROSYPAL AC, ZAJAC AM, LINDSAY DS. Canine visceral leishmaniasis and its emergence in the United States. *Veterinary Clinics of North America*, 33(4): 921–937; 2003.

SAKANARI JA, NADLER SA, CHAN VJ, ENGEL JC, LEPTAK C, BOUVIER J. *Leishmania major*: comparison of the cathepsin L- and B-like cysteine protease genes with those of other trypanosomatids. *Experimental Parasitology*, 85(1): 63-76; 1997.

SALEM NY, FARAG HS. Clinical, hematologic, and molecular findings in naturally occurring *Babesia canis vogeli* in Egyptian dogs. *Veterinary Medicine International*, 4: 270345; 2014.

SAMPAIO MJA, CAVALCANTI NV, ALVES JGB, FERNANDES FILHO MJC, CORREIA JB. Risk factors for death in children with visceral leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(11): e877; 2010.

SANTARÉM N, TOMÁS A, OUAISSI A, TAVARES J, FERREIRA N, MANSO A, CAMPINO L, CORREIA JM, CORDEIRO-DA-SILVA A. Antibodies against a *Leishmania infantum* peroxiredoxin as a possible marker for diagnosis of visceral leishmaniasis and formonitoring the efficacy of treatment. *Immunology Letters*, 101(1): 18–23; 2005.

SANTOS ESC, ANDRADE PP, MENZ I, QUEIROZ IM. Discriminação sorológica entre animais infectados e vacinados pela vacina Leishmune[®] com o kit ELISA/S7 - Biogene[®]. Revista de Patologia Tropical, 36(supl. 2); 2007.

SCALONE A, DE LUNA R, OLIVA G, BALDI L, SATTI G, VESCO G, MIGNONE W, TURILLI C, MONDESIRE RR, SIMPSON D, DONOGHUE AR, FRANK GR, GRADONI L. Evaluation of the *Leishmania* recombinant k39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. Veterinary Parasitology, 104(4): 275-85; 2002.

SHREFFLER WG, BURNS JM JR, BADARÓ R, GHALIB HW, BUTTON LL, MCMASTER WR, REED SG. Antibody responses of visceral leishmaniasis patients to gp63, a major surface glycoprotein of *Leishmania* species. Journal of Infectious Diseases, 167(2): 426-430; 1993.

SILVA CB, VILELA JA, PIRES MS, SANTOS HA, FALQUETO A, PEIXOTO MP, OLIVEIRA TDE A, SANTOS FN, SILVA VL, SANAVRIA A, MASSARD CL. Seroepidemiological aspects of *Leishmania* spp. in dogs in the Itaguaí micro-region, Rio de Janeiro, Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 22(1): 39-45; 2013.

SILVA ES, ROSCOE EH, ARRUDA LQ. Leishmaniose visceral canina: estudo clínico-epidemiológico e diagnóstico. Revista Brasileira de Medicina Veterinária, 23(4): 111-116; 2001.

SILVA KR, MENDONÇA VR, SILVA KM, NASCIMENTO LF, MENDES-SOUSA AF, PINHO FA, BARRAL-NETTO M, BARRAL AM, CRUZ MD. Scoring clinical signs can help diagnose canine visceral leishmaniasis in a highly endemic area in Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 112(1): 53-62; 2017.

SILVA LA. Aspectos da leishmaniose visceral canina: epidemiologia, sorologia e novas perspectivas de tratamento [tese de doutorado em Patologia]. Bahia: Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Curso de Patologia; 2011.

SILVA OA, BRAGA GMS. Leishmaniose visceral canina no município São Vicente Férrer, Estado de Pernambuco, Brasil. Revista Brasileira de Ciências Veterinárias, 15(2): 101-102; 2008.

SILVA RA, ANDRADE AJ, QUINT BB, RAFFOUL GES, WERNECK GL, RANGEL EF, ROMERO GAS. Effectiveness of dog collars impregnated with 4% deltamethrin in controlling visceral leishmaniasis in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 113(5): e170377; 2018.

SKEIKY YA, BENSON DR, COSTA JL, BADARO R, REED SG. Association of *Leishmania* heat shock protein 83 antigen and immunoglobulin G4 antibody titers in Brazilian patients with diffuse cutaneous leishmaniasis. *Infection and Immunity*, 65(12): 5368-5370; 2008.

SKEIKY YAW, BENSON DR, ELWASILA M, BADARO R, BURNS JR JM., REED SG. Antigens shared by *Leishmania* species and *Trypanosoma cruzi*: immunological comparison of the acidic ribosomal P0 proteins. *Infection and Immunity*, 62(5): 1643–1651; 1994.

SKEIKY YA, BENSON DR, GUDERIAN JA, WHITTLE JA, BACELAR O, CARVALHO EM, REED SG. Immune responses of leishmaniasis patients to heat shock proteins of *Leishmania* species and humans. *Infection and Immunity*, 63(10): 4105–4114; 1995.

SOLANO-GALLEGO L, MORELL P, ARBOIX M, ALBEROLA J, FERRER L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(2): 560–563; 2001.

SOOSARAEI M, FAKHAR M, HOSSEINI TESHNIZI S, ZIAEI HEZARJARIBI H, BANIMOSTAFAVI ES. Medicinal plants with promising antileishmanial activity in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Annals of Medicine and Surgery*, 21: 63-80; 2017.

SOTO M, ALONSO C, REQUENA JM. The *Leishmania infantum* acidic ribosomal protein LiP2a induces a prominent humoral response in vivo and stimulates cell proliferation in vitro and interferon-gamma (IFN-gamma) production by murine splenocytes. *Clinical and Experimental Immunology*, 122(2): 212-218; 2000.

SOTO M, RAMIREZ L, PINEDA MA, GONZALEZ VM, ENTRINGER PF, OLIVEIRA CI, NASCIMENTO IP, AP, CORVO L, ALONSO C, BONAY P, BRODSKYN C, BARRAL A, BARRAL-NETTO M, IBORRA S. Searching genes encoding *Leishmania* antigens for diagnosis and protection. *Scholarly Research Exchange*, 23: 1-25; 2009.

SOTO M, REQUENA JM, GOMEZ LC, NAVARRETE I, ALONSO C. Molecular characterization of a *Leishmania donovani infantum* antigen identified as histone H2A. *European Journal of Biochemistry*, 205(1): 211–216; 1992.

SOTO M, REQUENA JM, QUIJADA L, ALONSO C. Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(1): 58-63; 1998.

SOTO M, REQUENA JM, QUIJADA L, ALONSO C. Specific serodiagnosis of human leishmaniasis with recombinant *Leishmania* P2 acidic ribosomal proteins. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 3(4): 387-391; 1996.

SOTO M, REQUENA JM, QUIJADA L, GARCÍA M, GUZMAN F, PATARROYO ME, ALONSO C. Mapping of the linear antigenic determinants from the *Leishmania infantum* histone H2A recognized by sera from dogs with leishmaniasis. *Immunology Letters*, 48(3): 209-214; 1995.

SOTO M, REQUENA JM, QUIJADA L, PEREZ MJ, NIETO CG, GUZMAN F, PATARROYO ME, ALONSO C. Antigenicity of the *Leishmania infantum* histones H2B and H4 during canine visceral leishmaniasis. *Clinical & Experimental Immunology*, 115(2): 342-349; 1999.

SOUZA AP, SOTO M, COSTA JM, BOAVENTURA VS, DE OLIVEIRA CI, CRISTAL JR, BARRAL-NETTO M, BARRAL A. Towards a more precise serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis using *Leishmania* recombinant proteins. *PLoS One*, 8(6): e66110; 2013.

SOUZA YCP, CARVALHO AFS, CARVALHO LAR, MANSUR VFR. Testes diagnósticos para leishmaniose visceral – atualidade e perspectivas. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, 21(1): 1-16; 2013.

SRIVASTAVA P, DAYAMA A, MEHROTRA S, SUNDAR S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2011; 105(1): 1-6; 2011.

SRIVIDYA G, KULSHRESTHA A, SINGH R, SALOTRA P. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. *Parasitology Research*, 110(3): 1065-1078; 2012.

STAUCH A, SARKAR RR, PICADO A, OSTYN B, SUNDAR S, RIJAL S, BOELAERT M, DUJARDIN JC, DUERR HP. Visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent: modelling epidemiology and control. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(11): e1405; 2011.

SUNDAR S, RAÍ M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(5): 951-8; 2002.

SUNDAR S, SINGH RK, MAURYA R, KUMAR B, CHHABRA A, SINGH V, RAI M. Serological diagnosis of Indian visceral leishmaniasis: direct agglutination test versus rK39

strip test. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 100(6): 533-537; 2006.

SUNDAR S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. Tropical Medicine & International Health, 6(11): 849-854; 2003.

TAFURI WL, OLIVEIRA MR, MELO MN. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. Veterinary Parasitology, 96(3): 203-12; 2001.

TANAKA AK, GORIN PAJ, STRAUS AH. Role of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigote glycosphingolipids in macrophage infectivity. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 40(6): 799-806; 2007.

TASCA KI, BUZETTI WAS, TENORIO MS, PAULAN SC, LIMA FL, QUEIROZ NMGP, MACHADO RZ, OLIVEIRA TMFS, NEVES MF, NORONHA JR ACF, ASSIS J. Exames parasitológicos, imunoistoquímicos e histopatológicos para detecção de *Leishmania chagasi* em tecidos esplênicos de cães com leishmaniose visceral. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 18(1): 27-33; 2009.

TAUIL PL. Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 39(3): 275-7; 2006.

TEIXEIRA MC, OLIVEIRA GG, SILVANY MA, ALCÂNTARA-NEVES NM, SOARES MB, RIBEIRO-DOS-SANTOS R, JERÔNIMO SM, COSTA CH, DOS-SANTOS WL, EICHINGER D, PONTES-DE-CARVALHO L. A strategy for identifying serodiagnostically relevant antigens of *Leishmania* or other pathogens in genetic libraries. Biologicals, 35(1): 51-4; 2007.

TRUJILLO C, RAMÍREZ R, VÉLEZ ID, BERBERICH C. The humoral immune response to the kinetoplastid membrane protein-11 in patients with American Leishmaniasis and Chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes. Immunology Letters, 70(3): 203-209; 2000.

TSUKAYAMA P, LUCAS C, BACON DJ. Typing of four genetic loci discriminates among closely related species of New World *Leishmania*. International Journal for Parasitology, 39(3): 355-362; 2009.

VANNIER-SANTOS MA, MARTINY A, DE SOUZA W. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. Current Pharmaceutical Design, 8(4): 297-318; 2002.

- VEEKEN H, RITMEIJER K, SEAMAN J, DAVIDSON R. Comparison of an rK39 dipstick rapid test with direct agglutination test and splenic aspiration for the diagnosis of kala-azar in Sudan. *Tropical Medicine & International Health*, 8(2): 164–167; 2003.
- VELO E, PAPARISTO A, BONGIORNO G, DI MUCCIO T, KHOURY C, BINO S, GRAMICCIA M, GRADONI L, MAROLI M. Entomological and parasitological study on phlebotomine sandflies in central and northern Albania. *Parasite*, 12(1): 45–49; 2005.
- VIEIRA JBF, COELHO GE. Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 31(suppl 2): 85–92; 1998.
- WANG Y, WU W, NEGRE NN, WHITE KP, LI C, SHAH PK. Determinants of antigenicity and specificity in immune response for protein sequences. *BMC Bioinformatics*, 12: 251; 2011.
- WEBB JR, CAMPOS-NETO A, OVENDALE PJ, MARTIN TI, STROMBERG EJ, BADARO R, REED SG. Human and murine immune responses to a novel *Leishmania major* recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. *Infection and Immunity*, 66(7): 3279–3289; 1998.
- WERNECK GL. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. *Revista de Saude Publica*, 48(5): 851–6; 2014.
- YOUNG DB. Heat-shock proteins: immunity and autoimmunity. *Current Opinion in Immunology*, 4(4): 396–400; 1992.
- ZANETTE MF, LIMA VMF, LAURENTI MD, ROSSI CN, VIDES JP, VIEIRA RFC, BIONDO AW, MARCONDES M. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47(1): 105–107; 2014.
- ZANETTE MF. Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina [dissertação de mestrado]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária da Unesp; 2006.
- ZAVERUCHA DO VALLE T, GASPAR EB, SOUZA-LEMOS C, SOUZA CS, MÁRQUEZ FB, BAETAS-DA-CRUZ W, D'ESCOFIER LN, CÔRTE-REAL S, CALABRESE KS, DA COSTA SC. Experimental *Leishmania (L.) amazonensis* leishmaniasis: characterization and

immunogenicity of subcellular fractions. *Immunological Investigations*, 36(4): 473-492; 2007.

ZEMZOUMI K, SERENO D, FRANÇOIS C, GUILVARD E, LEMESRE JL, OUAISSI A. *Leishmania major*: cell type dependent distribution of a 43 kDa antigen related to silent information regulatory-2 protein family. *Biology of the Cell*, 90(3): 239-245; 1998.

ZEYREK FY, KORKMAZ M, OZBEL Y. Serodiagnosis of anthroponotic cutaneous leishmaniasis (ACL) caused by *Leishmania tropica* in Sanliurfa Province, Turkey, where ACL Is highly endemic. *Clinical Vaccine Immunology*, 14(11):1409-15; 2007.

ZHAO S, KUANG Y, WU CH, BEN-ARIEH D, RAMALHO-ORTIGAO M, BI K. Zoonotic visceral leishmaniasis transmission: modeling, backward bifurcation, and optimal control. *Journal of Mathematical Biology*, 73(6-7):1525-1560; 2016.

ZIJLSTRA EE, EL-HASSAN AM. Leishmaniasis in Sudan. Visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(supl. 1): 27-58; 2001.

ZURITA AI, RODRÍGUEZ J, PIÑERO JE, PACHECO R, CARMELO E, CASTILLO AD, VALLADARES B. Cloning and characterization of the *Leishmania (Viannia) braziliensis* HSP70 gene. Diagnostic use of the C-terminal fragment rlb70(513-663). *Journal of Parasitology*, 89(2): 372-378; 2003.